

**Funktionelle Untersuchungen zur
Expression des Interleukin-11 Rezeptors α
in humanen Kolonepithelzellen**



DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.) der Naturwissenschaftlichen

Fakultät IV - Chemie und Pharmazie

der Universität Regensburg

2002

vorgelegt von

Stephan Kießling

aus Hirschau

Die vorliegende Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Armin Buschauer
Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie II
Universität Regensburg

und

PD Dr. Dr. Gerhard Rogler
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I
Universitätsklinikum Regensburg

Promotionsgesuch eingereicht am 25.02.02

Mündliche Prüfung voraussichtlich am 28.03.02

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Georg Schmeer
1. Prüfer:	Prof. Dr. Armin Buschauer
2. Prüfer:	PD Dr. Dr. Gerhard Rogler
3. Prüfer:	Prof. Dr. Claudia Steinem

Wenn ein Problem gelöst werden kann,
ist es sinnlos sich Gedanken zu machen.

Wenn es nicht gelöst werden kann,
sind Gedanken auch nicht gut.

Buddhistisches Sprichwort

FÜR MEINE ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

I EINLEITUNG	1
I.1 Aufbau und Funktion des menschlichen Darms	1
I.2 Die Kolonmukosa	2
I.3 Kolonepithelzellen	3
I.3.1 Aufbau und Funktion der Kolonepithelzellen	3
I.3.2 Differenzierung und Apoptoseinduktion der Epithelzellen entlang der Krypten-Lumen-Achse	4
I.3.3 Rolle der Kolonepithelzellen im intestinalen Immunsystem	6
I.3.4 Rolle der Kolonepithelzellen bei der Entzündung	7
I.4 Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn	9
I.5 Zytokine	10
I.5.1 Allgemeine Definition	10
I.5.2 Rolle und Bedeutung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	11
I.6 Das Interleukin-11-System	13
I.6.1 Interleukin-11	13
I.6.2 Interleukin-11 Rezeptor α	15
I.6.3 Funktioneller Rezeptorkomplex und Signaltransduktion	16
I.7 Arbeitsziele	19
 II MATERIAL	 21
II.1 Herkunft von Material und Geräten	21
II.1.1 Material für die Zellkultur	21
II.1.2 Geräte für die Zellkultur	22
II.1.3 Material und Geräte für die Durchflusszytometrie	22
II.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	22
II.2.1 Chemikalien	22
II.2.2 Verbrauchsmaterial	24
II.3 Sonstige Geräte	25
II.4 Reagenziensätze (Kits)	26
II.5 Oligonukleotid-Primer	26
II.6 Zytokine	27
II.7 Standards und Marker	27
II.8 Antikörper	27
II.8.1 Primäre Antikörper	28

II.8.2 Sekundäre Antikörper	29
II.8.3 Isotypkontrollen	29
II.9 Nährmedien und Puffer	30
II.9.1 Zellkulturmedien	30
II.9.2 Puffer und Lösungen	30
III METHODEN	35
III.1 Zellkultur	35
III.1.1 Allgemeine Zellkulturtechniken	35
III.1.1.1 Bestimmung der Zellzahl	35
III.1.1.2 Einfrieren von Zellen	35
III.1.1.3 Auftauen von Zellen	36
III.1.2 HT-29 Zelllinie	36
III.1.3 Isolierung primärer humaner Kolonepithelzellen	36
III.1.3.1 Aus Darmresektaten	36
III.1.3.2 Aus Biopsien	37
III.1.4 Kultur primärer humaner Kolonepithelzellen	38
III.2 Nukleinsäuretechniken	38
III.2.1 RNA-Isolierung	38
III.2.2 Konzentrationsbestimmung von RNA	39
III.2.3 Reverse Transkription von mRNA / cDNA-Synthese	39
III.2.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	40
III.2.5 Gelelektrophorese	42
III.2.5.1 Qualitative Auftrennung von DNA	42
III.2.5.2 Qualitative Auftrennung von RNA	43
III.2.6 cDNA Verdau	44
III.2.7 Northern Blotting	44
III.2.7.1 RNA-Transfer durch Northern Blot	44
III.2.7.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	45
III.2.7.3 Markierung von cDNA-Sonden	46
III.2.7.4 Abtrennung freier Nukleotide	47
III.2.7.5 Hybridisierung und Waschen	47
III.2.7.6 Autoradiographie	48
III.3 Protein-Nachweismethoden	49
III.3.1 Immunhistochemie	49
III.3.1.1 Gefrierschnitte	49
III.3.1.2 Färbungen mit der DAB-Methode	49

III.3.2 Western Blotting	51
III.3.2.1 Zytosolpräparation	51
III.3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	52
III.3.2.3 Vorbereitung der Proben	52
III.3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
III.3.2.5 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran (Blotten)	53
III.3.2.6 Färbung der Membran mit Ponceau S	54
III.3.2.7 Immundetektion der Proteine	54
III.3.2.8 Stripping der Nitrozellulosemembran	55
III.3.3 IL-8 ELISA	55
III.3.4 Fluorometrische Messung der Caspase-9 Aktivität	56
III.3.5 MTS-Viabilitätstests	56
III.4 Durchflusszytometrie	57
III.4.1 Optisches System und Lichtdetektion	57
III.4.2 Interpretation und Auswertung der Daten	59
III.4.3 Direkte Markierung von Oberflächenantigenen	59
III.4.4 Indirekte Markierung von Oberflächenantigenen	60
III.4.5 Doppelfärbung	60
III.4.6 DNA-Färbung mit Propidiumiodid	61
III.4.6.1 Zellzyklus-Analyse und Apoptose Nachweis	62
III.4.6.2 Zell-Dublettendiskriminierung	63
IV ERGEBNISSE	65
IV.1 Untersuchungen zur IL-11R α Expression in der humanen Kolonmukosa	65
IV.1.1 Lokalisation der IL-11R α Expression	65
IV.1.2 Immunhistochemischer Nachweis der IL-11R α Expression in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29	67
IV.1.3 Phänotypisierung der isolierten primären Zellen aus Kolonresektaten	68
IV.1.3.1 Durchflusszytometrische Analyse des Reinheitsgrades der Epithelzellfraktion	68
IV.1.3.2 Durchflusszytometrische Analyse auf kontaminierende Zellen in der Epithelzellfraktion	70
IV.1.3.3 Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoserate primärer humaner Kolonepithelzellen nach der Epithelzellisolation	72
IV.1.4 Untersuchung der IL-11R α Transkription in Kolonepithelzellen	73
IV.1.4.1 Expression von IL-11R α mRNA in der RT-PCR	74
IV.1.4.2 Expression von IL-11R α mRNA im Northern Blot	75

IV.1.5 Analyse der IL-11R α Expression in Kolonepithelzellen	76
IV.1.5.1 Expression von IL-11R α Protein im Western Blot	76
IV.1.5.2 Zelloberflächenexpression von IL-11R α Protein in der Durchflusszytometrie	78
IV.1.5.2.1 Titration des monoklonalen anti-IL-11R α Antikörpers für die durchflusszytometrische Analyse	78
IV.1.5.2.2 IL-11R α Zelloberflächenexpression in der Durchflusszytometrie	79
IV.1.6 Analyse der gp130 Ko-Expression in Kolonepithelzellen	82
IV.1.6.1 gp130 Ko-Expression im Western Blot	82
IV.1.6.2 gp130 Zelloberflächenexpression in der Durchflusszytometrie	83
IV.2 Untersuchungen zur IL-11-induzierten Signaltransduktion in Kolonepithelzellen	84
IV.2.1 Jak1 Phosphorylierung im Western Blot	84
IV.2.2 STAT3 Phosphorylierung im Western Blot	86
IV.2.3 STAT3 Phosphorylierung in der Immunhistochemie	88
IV.3 Analyse möglicher immunmodulatorischer oder zytoprotektiver Effekte von IL-11 in Kolonepithelzellen	89
IV.3.1 Anti-inflammatorische Einflüsse von IL-11	90
IV.3.1.1 Effekte von IL-11 auf die TNF-induzierte IL-8 Sekretion im ELISA	90
IV.3.1.2 I κ B- α Proteinexpression und Degradierung nach TNF Stimulation im Western Blot	93
IV.3.1.3 IL-11R α Expression nach Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen in der Durchflusszytometrie	95
IV.3.2 Proliferationsinduzierende Effekte von IL-11	97
IV.3.2.1 MTS-Viabilitätstest	97
IV.3.2.2 Durchflusszytometrische Zellzyklus-Analyse	98
IV.3.3 Anti-apoptotische Effekte von IL-11	101
IV.3.3.1 Bcl-2 Expression im Western Blot	101
IV.3.3.2 Akt-Phosphorylierung im Western Blot	103
IV.3.3.3 Fluorometrischer Nachweis der Caspase-9 Aktivität in primären humanen Kolonepithelzellen	106
IV.3.3.4 Zellverankerungsabhängige Apoptose von primären humanen Kolonepithelzellen in der Durchflusszytometrie	107
V DISKUSSION	109
V.1 IL-11R α Expression in der humanen Kolonmukosa	110
V.2 IL-11R α Expression in humanen Kolonepithelzellen	111
V.2.1 IL-11R α Expression auf Transkriptionsebene	111

V.2.2 IL-11R α Expression auf Translationsebene	112
V.2.3 IL-11R α Zelloberflächenexpression	113
V.3 Funktionalität der IL-11R α Expression in Kolonepithelzellen	114
V.3.1 Ko-Expression der signaltransduzierenden Untereinheit gp130	114
V.3.2 IL-11-induzierte Jak/STAT Signaltransduktion	115
V.4 Charakterisierung der IL-11-induzierten Downstream-Effekte in Kolonepithelzellen	118
V.4.1 Anti-inflammatorische Einflüsse von IL-11	119
V.4.2 Proliferationsinduzierende Einflüsse von IL-11	122
V.4.3 Anti-apoptotische Einflüsse von IL-11	123
V.4.3.1 Bcl-2 Proteinexpression	124
V.4.3.2 Phosphorylierung der Proteinkinase B / Akt	126
V.4.3.3 Inhibierung der Caspase-9 Aktivität	129
V.5 Ausblick	130
 VI ZUSAMMENFASSUNG	 132
 VII LITERATURVERZEICHNIS	 135
 VIII ANHANG	 149
Publikationen	149
Kongressbeiträge	149
Danksagung	152
Erklärung	154

ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	Bicinchinonsäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEC	Primäre humane Kolonepithelzellen (Colonic Epithelial Cells)
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay)
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter)
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-11R α	Interleukin-11 Rezeptor α
Jak	Janus Kinase
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mA	Milli-Ampere
MEM	Minimal Essential Medium
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
MOPS	γ -Morpholino-propan-sulfonsäure
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MTS	3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy-phenyl)- 2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
mV	Milli-Volt
MW	Mittelwert

OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PKB	Protein Kinase B
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMT	Photomultiplier
PTK	Protein Tyrosinkinasen
P/S	Penicillin / Streptomycin
PY	Phosphotyrosin
rek.	rekombinant
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
SD	Standardabweichung des Mittelwertes
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat
sek	Sekunden
SSC	Seitenstreulicht (Sideward Scatter)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung (Tris Buffered Saline)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
Tyr	Tyrosin
u	Einheiten (Units)
U/min	Umdrehungen/Minute
UV	Ultraviolett

I EINLEITUNG

I.1 Aufbau und Funktion des menschlichen Darms

Der menschliche Darm bildet mit einer Oberfläche von ca. 300 m² die größte Kontaktfläche des Körpers mit der Außenwelt. Mit ihrer ca. 50x größeren Oberfläche im Vergleich zur Haut muss die Darmschleimhaut zwei eigentlich sich widersprechende Funktionen ausüben, die sich auch im Aufbau der Darmwand widerspiegeln:

Einerseits ist sie für die Resorption der Nahrung verantwortlich, andererseits aber muss sie sich und den gesamten Körper gleichzeitig vor einer permanenten Exposition mit Verdauungsenzymen, Nahrungsantigenen, pathogenen Keimen und Bakterien und vor deren Eindringen aus dem Darmlumen in die Mukosa und die Zirkulation schützen. Die Wand von Dünndarm und Dickdarm (Abbildung I.1) ist prinzipiell gleichartig aus vier konzentrischen Schichten aufgebaut.

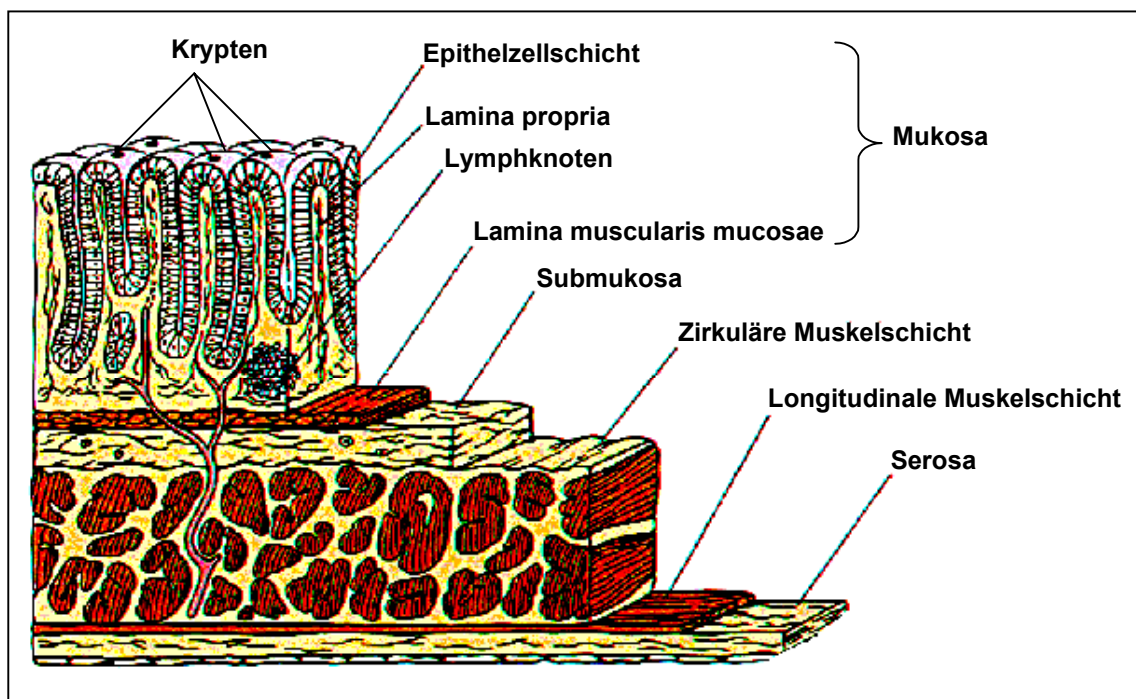


Abbildung I.1: Schematischer Aufbau der Darmwand des Kolons (adaptiert nach [1]).

Das Lumen des Darmes wird von einer spezialisierten Schleimhaut, der sogenannten Mukosa ausgekleidet. Bei der Submukosa handelt es sich um ein loses Maschenwerk von dünnen Kollagenfibrillen, die die Mukosa mit der Muscularis propria verbinden. Die Submukosa wird von Blutgefäßen und Lymphbahnen durchzogen. Lateral von der Submukosa schließt sich eine Schicht aus Ringmuskulatur sowie eine Schicht aus Längsmuskulatur an. Die Darmwand wird durch die Serosa begrenzt, die beim Dünndarm und Teilen des Dickdarms durch ein Band (Mesenterium) an der hinteren Bauchwand befestigt ist (Mesenterialwurzel).

I.2 Die Kolonmukosa

Der Mukosa, die sich in drei Subschichten gliedert, werden die meisten physiologischen Aufgaben des Darms zugeordnet. Die Mukosa des Dickdarms (Kolonmukosa) wird von einer einschichtigen Epithelzellschicht bedeckt. Die schleimbedeckten Zellen dieses Oberflächenepithels sind auf einer vom Stroma abgegrenzten Basalmembran fixiert und kleiden die dazwischenliegenden Gewebseinsenkungen, die Krypten (siehe Abbildung I.1), aus. Jede Krypte beinhaltet näherungsweise 250 Zellen, abhängig von der Art und der anatomischen Lage [2]. Die auf diesem Weg erzielte Oberflächenvergrößerung stellt eine möglichst effiziente Verdauung und Absorption der Nahrungsstoffe (im Dünndarm) bzw. eine optimale Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes sicher. Das Querschnittrelief der Kolonmukosa ist relativ flach und besitzt nur halbmondförmig ausgebildete Falten und Ausbuchtungen. Die Kolonmukosa ist durch eine exklusive Kryptenarchitektur, eine weitgehend parallele Anordnung der Krypten, ein becherzellreiches Epithel und ein leukozytenarmes Stroma gekennzeichnet. Das Oberflächenepithel besitzt einen Bürstensaum, der allerdings weit weniger ausgeprägt ist als im Dünndarm. Die Länge der Krypten nimmt von oral nach aboral hin zu [3].

Das Gewebe unter der Epithelzellschicht, die Lamina propria, wird von Lymphgefäßen, Blutgefäßen und Nervenbahnen durchzogen. Im Bindegewebe der Lamina propria finden sich hauptsächlich Lymphozyten, Makrophagen und Myofibroblasten. Die Lamina muscularis mucosae, eine etwa 5 Zellen dicke Schicht von glatten Muskelzellen, trennt die Lamina propria von der Submukosa und spielt eine wichtige Rolle bei der Darmmotilität.

I.3 Kolonepithelzellen

I.3.1 Aufbau und Funktion der Kolonepithelzellen

Die klassische Funktion der Epithelzellen im Kolon besteht v.a. in der Absorption von Flüssigkeit und Elektrolyten. Darüber hinaus stellt die einschichtige Epithelzellschicht die primäre Barriere gegen Antigene und Pathogene aus dem Darmlumen dar. Die epitheliale Zelloberfläche des Darmes ist die größte Kontaktfläche des menschlichen Körpers zu seiner Umwelt und ist somit für die Aufrechterhaltung der physiologischen Körperintegrität von zentraler Bedeutung. Die selektive Barrierefunktion des Darms wird hauptsächlich von den Epithelzellen der Darmschleimhaut (z.B. über *tight junctions*) und den von ihnen produzierten Muzinen (z.B. Kleeblattpeptide) erfüllt [4]. Zylindrische Kolonepithelzellen besitzen an ihrer luminalen Oberfläche Mikrovilli mit einer Glykokalix aus verschiedenen Glykoproteinen, wie Peptidasen, Disaccharidasen oder alkalische Phosphatasen. In die Zellmembran der Epithelzellen sind außerdem Transportkanäle für Elektrolyte und Wasser, Transportproteine, energiekonvertierende Proteine (ATPasen) und spezifische Rezeptoren integriert. An der Oberfläche der Kolonozyten werden Proteine und Kohlenhydrate aktiv resorbiert, während freie Fettsäuren und Monoglyzeride durch die Plasmamembran diffundieren [3]. Abbildung I.2 zeigt den schematischen Aufbau einer Kolonepithelzelle.

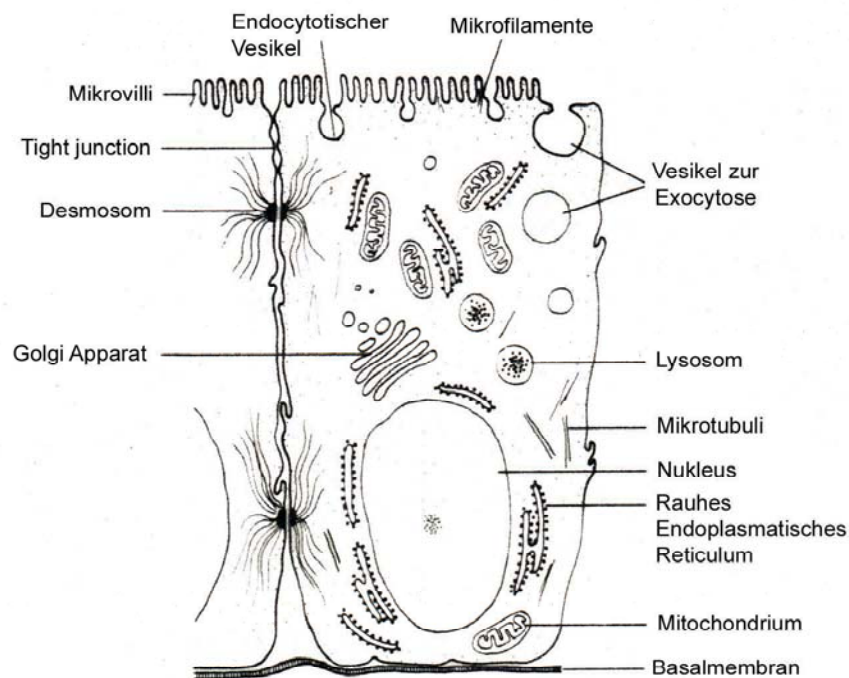


Abbildung I.2: Schematische Übersicht einer Kolonepithelzelle (entnommen aus [5]).

I.3.2 Differenzierung und Apoptoseinduktion der Epithelzellen entlang der Krypten-Lumen-Achse

Die Epithelzellschicht des menschlichen Kolons besteht aus einer sich ständig erneuernden Einzelzellschicht von Zellen und stellt eines der am schnellsten proliferierenden Gewebe des menschlichen Körpers dar [6]. Sämtliche Zellen dieser Epithelschicht entstammen undifferenzierten, epithelialen Stammzellen, die an der Basis der Lieberkühnschen Krypten lokalisiert sind [7-9]. Nach der Teilung migrieren die neu entstandenen Epithelzellen entlang der Krypten-Lumen-Achse und durchlaufen auf ihrer Wanderung einen Differenzierungsprozess [2,10,11]. Mit einer Lebensdauer von nur 3-5 Tagen haben humane intestinale Epithelzellen einen sehr kurzen Lebenszyklus, der mit Erreichen des Lumens durch Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) und einer Abschilferung der Zellen in das Lumen rasch beendet wird [12,13]. Die ausdifferenzierten Epithelzellen sind schließlich auf der Oberfläche der Krypte verteilt, während die proliferierenden und Mukus-produzierenden Becherzellen vorwiegend in der Kryptenmitte lokalisiert sind (Abbildung I.3).

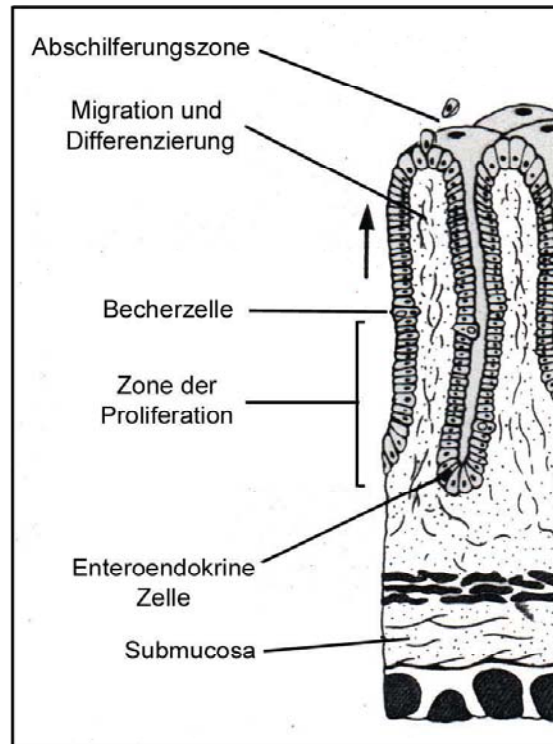


Abbildung 1.3: Migrations- und Differenzierungsprozess von Kolonepithelzellen entlang der Krypten-Lumen-Achse, (adaptiert nach [3]).

Zur Erhaltung der geschlossenen Epithelzellschicht muss ein eng reguliertes Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelldifferenzierung auf der einen Seite und Zelluntergang bzw. programmiertem Zelltod auf der anderen Seite bestehen. Die Kolonepithelzellen unterliegen einer spontanen, physiologischen Apoptose, die zur programmierten Beendigung des kurzen Lebenszyklus führt. Das Verständnis der molekularen Mechanismen, die zur Regulation und Auslösung der lumenassoziierten physiologischen Apoptose dieser Zellen führen, ist jedoch unvollständig [14]. Der Entzug verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie die Ablösung von Matrixbestandteilen oder die Isolierung von Einzelzellen aus dem Zellverband sind als Trigger ausreichend, um in diesem Zellsystem Apoptose zu induzieren [15-17]. Viele intrinsische Faktoren wie z. B. die Expression von Mitgliedern der Bcl-2/Bax-Proteinfamilie oder Umwelteinflüsse können zum Verlust des Zell-Zell-Kontakts oder Zell-Matrix-Kontakts führen. Auch der Kontakt zu kurzkettigen Fettsäuren oder Zytokinen kann die Induktion der Apoptose intestinaler Epithelzellen beeinflussen [17-21]. Die Mehrzahl der Epithelzellen benötigt die Adhäsion und Verankerung an Bestandteilen der Extrazellulärmatrix für Wachstum, Differenzierung und weiteres

Überleben. Die Abhängigkeit der Zelle von ihrer Verankerung ermöglicht ein geregeltes Wachstum und Ausdifferenzieren der Zellen an der richtigen Stelle innerhalb des Organismus. Der Einfluss von Adhäsionsmolekülen wie Integrinen, Cadherinen sowie von Matrixbestandteilen, die an spezifische Membranrezeptoren wie das $\beta 1$ -Integrin binden, sind über die Induktion wichtiger intrazellulärer Signalwege in hohem Maße an der Aufrechterhaltung der Epithelzellhomöostase im Intestinaltrakt beteiligt [21-23]. Ob die genannten Faktoren jeweils eine unmittelbare Rolle bei der Beendigung des Lebenszyklus von intestinalen Epithelzellen spielen, ist nach wie vor Gegenstand der Diskussion und im Einzelnen nicht geklärt.

1.3.3 Rolle der Kolonepithelzellen im intestinalen Immunsystem

Das intestinale Immunsystem hat für den Körper als das größte Immunorgan eine zentrale Bedeutung [24]. Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten, die in den Organismus eindringen werden in der Regel vom Immunsystem erkannt und beseitigt. An der Stelle der höchsten Antigen- und Pathogendichte, nämlich dem Darmlumen, muss das intestinale Immunsystem den Körper vor der Invasion von Pathogenen durch eine kontrollierte Immunantwort bewahren. Gleichzeitig muss aber eine überschießende Immunantwort, die zu einer permanenten Entzündungsreaktion führen würde, verhindert werden. Nahrungsbestandteile dürfen nicht als fremd erkannt werden, andererseits muss frühzeitig auf potentielle Noxen reagiert werden.

Wie bereits erwähnt, stellen die Epithelzellen des Kolons die primäre Barriere gegen Antigene und Pathogene aus dem Darmlumen dar. Der von den Epithelzellen produzierte Mukus, der eine Adhäsion von Erregern verhindern kann, spielt dabei eine wichtige Rolle und zählt zu den unspezifischen Komponenten des intestinalen Immunsystems. Die Epithelzellschicht ist nicht nur als passiver Teilnehmer agierend, sondern wirkt auch aktiv mit, indem sie die intestinale Immunreaktion moduliert. Die Epithelzellen lösen aber nicht für sich alleine eine Immunantwort aus. Sie sind auf die Interaktion mit anderen wichtigen zellulären Komponenten des intestinalen Immunsystems, wie z. B. Lymphozyten, Makrophagen und dem enterischen Nervensystem angewiesen. Diese Interaktion unterliegt einer Reihe von Kontroll- und Regelmechanismen, um einerseits das

Eindringen von pathogenen Keimen und andererseits Schäden durch die Entzündungsmediatoren selbst zu vermeiden. Die Regulationsmechanismen werden mit Hilfe eines komplexen Systems von löslichen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und durch direkte Zell-Zell-Interaktionen vermittelt. Epithelzellen interagieren durch Austausch von Botenstoffen, den sogenannten Zytokinen, mit den Zellen des Mukosa-assoziierten Immunsystems. Sie agieren als Signalübermittler, indem sie Informationen über die Zusammensetzung des Darminhalts an die benachbarten Zellen des intestinalen Immunsystems via Sekretion von Zytokinen weiterleiten. Sie besitzen dafür eine Vielzahl von Rezeptoren zur Signalaufnahme [25,26] und die Fähigkeit, Entzündungsmediatoren freizusetzen [27-32]. Diese löslichen Substanzen ermöglichen die Kommunikation der Immunzellen des Intestinaltraktes. Die unmittelbare Nähe von intestinalen Epithelzellen und anderen Zellen des Mukosa assoziierten Immunsystems lässt auch direkte Wechselwirkungen zwischen den Zellpopulationen vermuten. So legen aktuelle Daten aus unserer Arbeitsgruppe nahe, dass die Interaktion von intestinalen Epithelzellen eine bedeutende Rolle bei der gewebespezifischen Differenzierung von intestinalen Makrophagen spielt [33]. Intestinale Makrophagen gehören zu den wichtigsten Komponenten des intestinalen Immunsystems und sind unmittelbar subepithelial lokalisiert. Sie haben eine große Bedeutung bei der Immunreaktion gegenüber eintretenden Antigenen bei einem Defekt der strukturellen Integrität des intestinalen Epithels und bilden eine zweite immunologische Abwehrlinie.

I.3.4 Rolle der Kolonepithelzellen bei der Entzündung

Die Struktur des Epithelzellverbandes und die Funktion intestinaler Epithelzellen können durch exogene und endogene Faktoren wie Nahrung, pathogene Darmkeime und deren Toxine, schwere Stresszustände, Zytokine und Medikamente gestört werden [34].

Intestinale Epithelzellen spielen bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) eine wichtige Rolle. Die verschiedenen Theorien zur Ätiologie können in zwei grundsätzliche Modelle unterteilt werden [35].

Erstens: Ein Defekt der strukturellen Integrität des intestinalen Epithels führt zu einer Invasion von Antigenen aus dem Darmlumen. Dieser Vorgang kann durch

Aktivierung des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes in genetisch empfänglichen Patienten eine chronische Entzündung auslösen. Dieses erste Pathogenesemodell wird durch tierexperimentelle Daten unterstützt: Eine Störung des Zell-Zell-Kontakts und der Kryptenarchitektur durch genetische Veränderung des N-Cadherins oder des Keratin 8 löst eine chronische Entzündung im Darm aus [35].

Zweitens: Die Epithelzellen weisen eine defekte Signaltransduktion von Entzündungsmediatoren auf, was zu einer pathologischen Entzündung führt. In diesem Modell spielen die Epithelzellen eine aktive Rolle, indem sie die intestinale Immunreaktion modulieren.

Der größte Teil der Informationen zur Rolle intestinaler Epithelzellen stammt aus Arbeiten mit humanen oder murinen Zelllinien, die transformiert und entsprechend entdifferenziert sind. Wir haben daher eine Methode zur Isolation und Kultivierung von menschlichen intestinalen Epithelzellen in Primärkultur entwickelt [36]. Das in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Zellkultursystem erlaubt eine Quantifizierung der Zytokinsynthese in intestinalen Epithelzellen in Primärkultur und den direkten Vergleich mit der Zytokinsynthese durch Lamina propria-Zellen aus dem gleichen Darmpräparat. Es fand sich interessanterweise, dass die intestinalen Epithelzellen vor allem den anti-inflammatorisch wirkenden Interleukin-1-Rezeptor Antagonisten (IL-1RA) und geringe Mengen IL-8 synthetisieren, während die Lamina propria-Zellen mehr pro-inflammatorisch wirkende Zytokine wie IL-1, IL-6 und IL-8 synthetisieren [29,31]. Dies könnte bedeuten, dass die Epithelzellen in gesunder Mukosa durch ihre anti-inflammatorische Wirkung die physiologische Entzündungsreaktion im Darm kontrollieren und dass diese Kontrolle nach Verletzung der Epithelschicht aufgehoben wird, was zur Entstehung und Unterhaltung einer akuten und vielleicht auch chronischen Entzündung beiträgt.

Auch in verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass eine Überproduktion von pro- bzw. eine Unterproduktion von anti-inflammatorisch wirkenden Zytokinen zu einer pathologischen Entzündung führen kann.

I.4 Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn

Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn zählen zu den chronisch entzündlichen Erkrankungen des Darmes, deren Ätiologie und Pathogenese bislang nicht geklärt ist [37]. Beiden ist der chronische Verlauf und der Autoimmuncharakter gemein. Auch klinisch zeigen sie viele Gemeinsamkeiten. Typische Symptome sind abdominale Schmerzen und anhaltende Diarrhöen, mit bis zum Teil mehr als fünfzehn Stuhlgängen am Tag. Gelegentlich zeigen sich auch perianale Blutungen, die durch die persistierende bzw. rezidivierende Entzündung der Darmschleimhaut bedingt wird. Zudem führen beide Erkrankungen häufig zu Gewichtsabnahme und Mangelernährung. Verlauf, Ausdehnung und Schweregrad der Erkrankungen sind sehr variabel und nicht vorhersehbar. In der Mehrzahl der Fälle werden mehr oder minder lange Remissionsphasen von akuten Schüben unterbrochen. Bei etwa 10–20% der Patienten lässt sich ein chronisch aktiver Verlauf feststellen.

Bei der Colitis Ulcerosa handelt es sich um eine chronisch rezidivierende Erkrankung, die ausschließlich den Dickdarm befällt und mit Geschwürbildungen (Ulcerationen) einhergeht. Sie beginnt im Enddarm (Rektum), also dort, wo mit der größten Stuhlmasse die meisten Bakterien auf die Darmwand treffen, breitet sich kontinuierlich nach proximal aus und befällt in etwa 10% der Fälle das gesamte Kolon. Es ist jeweils nur die Mukosa betroffen, d.h. die Entzündung reicht nicht durch die gesamte Darmwand hindurch. Die Colitis Ulcerosa ist bislang nur durch eine totale Proktokolektomie, d.h. durch operative Entfernung des Dickdarms und der Enddarmschleimhaut heilbar.

Im Unterschied dazu ist der Morbus Crohn eine entzündliche Erkrankung aller Schichten der Darmwand. Er ist charakterisiert durch einen diskontinuierlichen Befall der Schleimhaut. Darüber hinaus befällt der Morbus Crohn nicht nur den Dickdarm, sondern es können sämtliche Abschnitte des Magen-Darm-Trakts vom Mund bis zum Enddarm betroffen sein. Beim Morbus Crohn handelt es sich insgesamt um ein komplexes Krankheitsbild, das durch verschiedene intestinale und extraintestinale Komplikationen gekennzeichnet sein kann. Die Entzündung lokalisiert sich außer in den oberflächlichen Schleimhautzellen auch in den darunter liegenden Schichten der Darmwand. Dadurch kann der Teil der Darmwand, der dem Bauchraum zugewandt ist, befallen sein. Dies führt in vie-

len Fällen zu Verwachsungen oder Fistelbildungen. Eine medikamentöse oder chirurgische Heilung der Erkrankung ist bisher nicht möglich. Die Therapie zielt vielmehr unspezifisch auf eine Reduktion des Entzündungsgeschehens und auf die Behebung von Komplikationen ab.

Alle Konzepte zur Pathogenese CED gehen zwar von einer unterschiedlichen Initiierung der Entzündung aus, sie stimmen jedoch darin überein, dass alle auslösenden Faktoren letztendlich in eine Überaktivierung des intestinalen Immunsystems münden. Die chronische Entzündung wird somit durch eine fehlregulierte und pathologisch übersteigerte Immunantwort vermittelt [24].

Eine spezifische medikamentöse Therapie mit dem Ziel der Heilung ist für beide Erkrankungen nicht bekannt. Ziel der therapeutischen Maßnahmen ist bis heute die symptomatische Behandlung der akuten Entzündung und die Verlängerung der Remissionsphasen.

I.5 Zytokine

Wie bereits erwähnt produzieren Kolonepithelzellen eine Reihe von Botenstoffen, um mit den Zellen des Mukosa-assoziierten Immunsystems zu interagieren. Darüber hinaus wird die Funktion der Kolonepithelzellen durch ein bestimmtes Zytokinmilieu moduliert. Die Regulationsmechanismen dieser Prozesse werden mit Hilfe eines komplexen Systems von löslichen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren vermittelt.

I.5.1 Allgemeine Definition

Der Begriff Zytokine wurde vor ca. 20 Jahren als Sammelbezeichnung für hormonähnliche Botenstoffe eingeführt, die nicht von Drüsen, sondern von unterschiedlichsten Blut- und Gewebezellen produziert und in die Umgebung abgegeben werden. Dabei handelt es sich um lösliche, körpereigene Faktoren, die von Immun- und Nicht-Immunzellen sezerniert werden und unter anderem eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen zu reifen Blutzellen spielen. Zudem haben sie eine entscheidende Rolle bei der Steuerung der Immunantwort. Sie regulieren die Aktivierung, das Wachstum und die Differenzierung von verschiedenen Lymphozytenpopulatio-

nen, von Entzündungszellen wie mononukleären Phagozyten, Neutrophilen und Eosinophilen und haben eine wichtige Funktion in der Antwort auf virale Infektionen.

Bei diesen Mediatoren handelt es sich meist um glykosylierte Proteine mit einer Molekularmasse von etwa 8-50 kDa. Sie agieren als Übermittler biologischer Signale nicht auf endokrinem, sondern auf para- und autokrinem Wege bereits in äußerst geringen Konzentrationen und sind normalerweise nicht im Serum nachweisbar. Die Zytokine wirken nicht wie die Immunglobuline antigenspezifisch, sondern ihre Aktivität ist antigenunspezifisch und unterliegt nicht der Restriktion durch den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) antigenpräsentierender Zellen. Im allgemeinen haben sie pleiotrope Wirkungsweise und überlappen in ihren Aktivitätsspektren.

Zu den Zytokinen rechnet man neben den Interleukinen (IL) auch Interferone (IFN), Wachstumsfaktoren, Chemokine, Kolonie-stimulierende-Faktoren (CSF) und die Tumor-Nekrose-Faktor-Familie (TNF-Familie). Diese Proteine sind zwar von ihrer Struktur her unterschiedlich, werden aber aufgrund ihrer vergleichbaren physiologischen Wirkungen zusammengefasst. Ein einzelnes Zytokin kann über spezifische Rezeptoren unterschiedliche Zelltypen aktivieren. Umgekehrt trägt ein bestimmter Zelltyp meist Rezeptoren für unterschiedliche Zytokine, die so eine Kommunikation mit mehr als einem Mediator erlauben. Dadurch entsteht das komplexe Netz der Zytokin-vermittelten Immunantwort, in dem positive und negative Rückkopplungsmechanismen eine wichtige Rolle spielen. Wechselseitige Beziehungen führen dazu, dass manche Zytokine synergistisch, andere antagonistisch wirken. Häufig findet man ganze Zytokinkaskaden mit komplizierten Regelkreisen.

I.5.2 Rolle und Bedeutung bei chronisch entzündlichen Darm-erkrankungen

In den letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass Zytokine eine wichtige Rolle bei der Entstehung und im Krankheitsverlauf CED spielen. Im Zusammenhang mit diesen Erkrankungen unterscheidet man pro-inflammatorische und anti-inflammatorische Zytokine, d.h. Mediatoren, die eine Entzündung verursachen und verstärken und solche, die eine Entzündungsreaktion herunterregulieren

bzw. beenden können. Zu den pro-inflammatorischen Zytokinen gehören insbesondere TNF, IL-1, IL-8, IL-12 und IL-18, zu den anti-inflammatorischen Zytokinen gehören unter anderem IL-4, IL-10 und IL-11. Auch im menschlichen Dünndarm und Dickdarm werden diese Mediatoren von verschiedenen Zellen gebildet und regulieren verschiedene Funktionen im Verdauungstrakt (Abbildung 1.4).

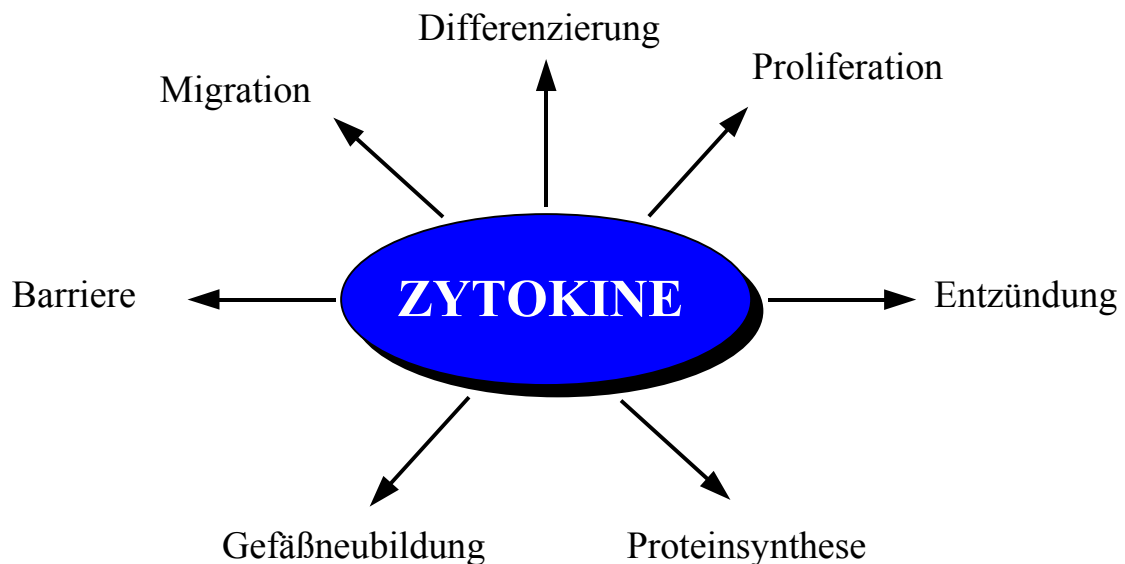


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Funktion von Zytokinen im Intestinaltrakt.

Bei der Steuerung des intestinalen Immunsystems in der normalen Mukosa existiert ein Gleichgewicht von pro-entzündlichen (z.B. IL-1, IL-8, TNF) [29,38] und anti-entzündlichen (z.B. IL-10, IL-4) Faktoren [39,40]. Bei CED ist dieses Gleichgewicht zwischen pro-entzündlichen und anti-entzündlichen Zytokinen gestört, ein Überwiegen der entzündungsfördernden Mechanismen wurde beschrieben [29,31,41].

Die Beeinflussung des Immunsystems bei Patienten mit CED durch Zytokine spielt eine wichtige Rolle, da die CED unter anderem durch eine gesteigerte Aktivierung des Immunsystems sowie Verletzungen der Darmschleimhaut mit Schleimhautgeschwüren, Fisteln und Fissuren gekennzeichnet sind [42]. Mit der Erkennung dieser Mediatoren, die die Entzündungsreaktion im Darm steuern können, sind eine Reihe neuartiger Therapieverfahren entwickelt worden, die derzeit in klinischen Studien untersucht werden. Um die Entzündungsreaktion zu reduzieren oder zu unterbrechen, erscheint es sinnvoll, entzündungsfördernde Botenstoffe zu neutralisieren. Als immunmodulatorische Maßnahme kann

der Einsatz von neutralisierenden Antikörpern oder eine gezielte Gabe von entzündungshemmenden bzw. anti-inflammatorischen Zytokinen erfolgen [43]. Ziel dieser klinischen Studien ist es, das außer Kontrolle geratene immunologische Gleichgewicht mit der überschüssenden Entzündungsreaktion durch deren Unterdrückung wieder ins Gleichgewicht zu bringen und dadurch die Krankungserscheinungen zu reduzieren.

I.6 Das Interleukin-11-System

I.6.1 Interleukin-11

Interleukin-11 (IL-11) ist ein multifunktionales Zytokin mit hämatopoetischen, immunologischen, zytoprotektiven und anti-inflammatorischen Eigenschaften. Es wurde erstmals 1990 als Proliferationsinduktor einer IL-6 abhängigen Plasmozytom-Zelllinie kloniert [44] und wird in vielen Geweben wie z.B. der Lunge, der Leber, dem ZNS, dem Gastrointestinaltrakt, der Haut und dem Thymus exprimiert [45]. Initial wurden diesem Zytokin hämatopoetische Eigenschaften und thrombopoetische Aktivität zugeordnet [46]. Eine Reihe weiterer biologischer Effekte konnten jedoch in der Zwischenzeit in einer Vielzahl von Geweben und Zellen beschrieben werden (zusammengefasst in [47]). Tabelle I.1 gibt eine Übersicht der nicht-hämatopoetischen Wirkungen von IL-11 auf verschiedene Zellarten:

Akute-Phase Proteinsynthese	Hepatozyten
anti-entzündliche Aktivität	Makrophagen, Monozyten
proliferative Effekte	B-Zellen, Epithelzellen
anti-apoptotische Einflüsse	versch. Zelllinien

Tabelle I.1: Übersicht der nicht-hämatopoetischen Eigenschaften von IL-11 auf diverse Zellarten.

Das reife humane IL-11 ist ein monomeres Protein, das aus 199 Aminosäuren besteht und keine potentiellen Glykosilierungsstellen besitzt. Es zeigt nach Expression in eukaryotischen Zellen ein Molekulargewicht von 19,1 kDa und wurde zu den Zytokinen mit einer konservierten Typ-Vier- α -Helix-Bündel-Struktur zugeordnet [48]. IL-11 gehört zu der Interleukin-6 Typ Subfamilie, die neben IL-6 auch *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), *Oncostatin M* (OSM) *Cardiotrophin* (CT-1) und *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF) umfasst [49-51].

Die Mitglieder dieser Zytokinfamilie binden spezifisch an ihre jeweiligen Rezeptoren (Alphakette), die aber keine direkte Signaltransduktion in das Zellinnere induzieren können. Die Signaltransduktion wird vielmehr durch das membranständige Glykoprotein gp130 vermittelt, das den Ligand/Rezeptorkomplexen als gemeinsame signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit dient [48,52,53]. Aufgrund dieser Tatsache werden die Mitglieder aus der IL-6-Familie auch als gp130 Zytokine bezeichnet [54].

Während anfangs die hämatopoetischen Effekte von IL-11 untersucht wurden, standen in den letzten Jahren verstärkt die immunmodulatorischen Eigenschaften von IL-11 im Zentrum des Interesses. In verschiedenen Tiermodellen und in klinischen Studien an Patienten mit einer akuten oder chronischen Entzündung, wie z.B. Rheumatoider Arthritis, Hepatitis, CED, Mukositis und Psoriasis zeichnete sich ein anti-inflammatorischer und zytoprotektiver Einfluss dieses Zytokins ab [47,55-58]. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass IL-11 eine Reduzierung der Th1 Zytokinproduktion (TNF, IL-1 β , IL-12, IFN γ) und NO-Produktion bei aktivierten Makrophagen und T-Zellen durch erhöhte I κ B-Proteinsynthese induziert [59-61]. Zudem konnte ein protektiver Effekt von IL-11 bei verschiedenen Arten von Schädigungen und Irritationen der Kolonmukosa nachgewiesen werden [45,56,62,63]. Eine IL-11-Applikation verminderte die Krankheitssymptome bei diversen Entzündungsmodellen im Tierversuch und spielt eine wichtige Rolle bei der Modulation des Ionentransportes von mukosalen Epithelzellen [64-67]. Aufgrund seiner immunmodulatorischen und zytoprotektiven Eigenschaften empfahl sich IL-11 für Studien zur Behandlung von CED. In einer klinischen Studien werden derzeit die anti-inflammatorischen Eigenschaften von IL-11 bei Patienten mit Morbus Crohn untersucht, unter anderem an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, der Universitätsklinik Regensburg. Im Rahmen dieser Phase III Multizenterstudie soll die Wirkungsweise

von subkutan injiziertem rekombinanten IL-11 (Neumega[®]) bei Patienten mit mäßig aktivem Morbus Crohn untersucht werden.

I.6.2 Interleukin-11 Rezeptor α

Die IL-11 Rezeptor α -Kette (IL-11R α) gehört zur Klasse-I-Zytokinrezeptor Superfamilie (CRSF) [68]. Die extrazelluläre Domäne dieser Rezeptorfamilie zeichnet sich durch die Gegenwart von mindestens einem konservierten Sequenzbereich, der sogenannten *cytokine receptor homology* (CRH), aus [69]. Die ca. 200 Aminosäuren umfassende CRH ist für die Ligandbindung der Rezeptoren verantwortlich. Sie besteht aus zwei Fibronectin-TypIII-ähnlichen Domänen, die aus jeweils sieben antiparallelen β -Faltblattsträngen und einer *immunoglobulin-like domain* (Ig) aufgebaut sind. Weitere Charakteristika der Klasse-I-Zytokinrezeptoren sind vier konservierte Cysteinreste innerhalb der N-terminalen Domäne, die durch Disulfidbrücken die dreidimensionale Struktur stabilisieren, sowie ein hochkonserviertes WSXWS-Motiv nahe der Transmembranregion. Der zytoplasmatische Anteil der Proteine aus der Klasse-I-Zytokinrezeptor-Superfamilie besitzt keine intrinsische Kinaseaktivität. Die Rezeptoren der IL-6-Typ Zytokine interagieren daher mit dem membranständigen Glykoprotein gp130, als gemeinsame signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit [52,53,70].

Die Klonierung des humanen IL-11R α wurde erstmals 1995 beschrieben [68]. Das Protein besteht aus 400 Aminosäuren. Die α -Kette des Rezeptors zeigt 84% Homologie zum murinen IL-11R α , der zuerst im Jahre 1994 kloniert werden konnte [71]. Gegenwärtig sind zwei verschiedene Isoformen des humanen IL-11R α beschrieben, die beide in der Zellmembran verankert sind [68,72]. Sie stimmen in ihrem extrazellulären und transmembranären Bereich überein. Beide Isoformen sind aktiv und unterscheiden sich lediglich in ihren zytoplasmatischen Domänen [68,73]. Einer Isoform fehlt die zytoplasmatische Domäne. Daten für eine IL-11R α mRNA Expression in murinen Zelllinien und primären Geweben des murinen Gastrointestinaltrakts liegen bereits vor [71,74,75]. In verschiedenen humanen Zelllinien konnte ebenfalls eine IL-11R α Transkription gezeigt werden [68]. Allerdings fehlen bisher konkrete Daten zur Expression des IL-11R α innerhalb der humanen Kolonmukosa.

I.6.3 Funktioneller Rezeptorkomplex und Signaltransduktion

In einem ersten Schritt bindet IL-11 mit geringer Affinität ($K_d \sim 10 \text{ nmol/l}$) an die α -Kette seines spezifischen Rezeptors [71]. Dieser durch Ligand-Rezeptorinteraktion präformierte Komplex, der allein nicht in der Lage ist, ein zelluläres Signal zu vermitteln, bindet in einem zweiten Schritt die signaltransduzierende Untereinheit gp130 [49,76]. Diese Oligomerisierung führt dann schließlich zur Signaltransduktion in das Innere der Zielzelle [52,54].

Gegenwärtig wird die Stöchiometrie des durch Ligandbindung von IL-11 induzierten funktionellen Rezeptorkomplexes als ein Hexamer, bestehend aus jeweils zwei Molekülen von IL-11, IL-11R α und gp130 beschrieben [77]. Durch systematische Mutagenesestudien wurden im IL-11 drei Epitope identifiziert, die für die Interaktion der einzelnen Rezeptoruntereinheiten benötigt werden. gp130 besitzt den Ergebnissen zufolge eine *Immunoglobulin-like domain* (Ig) und eine *Cytokine binding homology domain* (CHD) als Bindungsstellen für die zwei weiteren Rezeptorkomponenten des Hexamerkomplexes (Abbildung I.5).

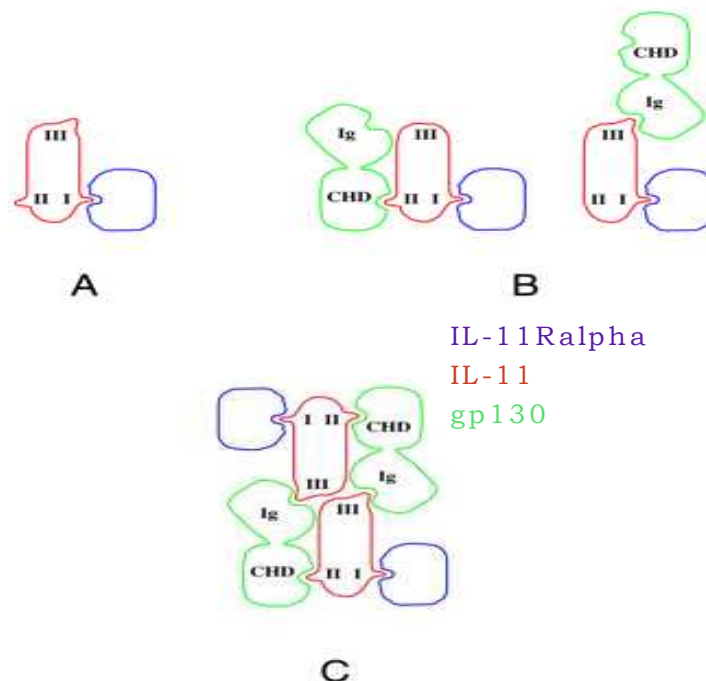


Abbildung I.5. Schematische Darstellung des funktionellen Hexamerkomplexes bestehend aus jeweils 2 Molekülen IL-11, IL-11R α und gp130 (C). IL-11/IL-11R α -Dimer (A) und die möglichen Isoformen des Trimers (B). CHD = Cytokine binding homology domain, Ig = Immunoglobulin, (entnommen aus [77]).

Rezeptoren, wie der IL-11R α , die keine eigene Kinaseaktivität aufweisen, können via Assoziation mit intrazellulären Tyrosinkinasen über gp130 zur Aktivierung einer Signalkaskade führen [78]. Die IL-11 induzierte Signaltransduktion ist durch ein dynamisches Gleichgewicht von Phosphorylierung und Dephosphorylierung zellulärer Serin- und Tyrosinkinasen aus der Jak/STAT-Familie beschrieben [79-82]. Die Mitglieder aus der Jak-Familie sind durch zwei Kinase-Domänen in jedem Molekül charakterisiert, von denen aber nur eine funktionell ist. Im Gegensatz zu vielen anderen zytoplasmatischen Kinasen verfügen die gegenwärtig bekannten vier Mitglieder (Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk1) weder über SH2- oder SH3- (Prolin-bindende) noch über PTB- (Phosphotyrosin-bindende) oder Lipid-bindende PH- (*Plekstrin homology*) Domänen [83,84].

Die Aggregation zytoplasmatischer Rezeptordomänen des Hexamerkomplexes phosphoryliert und aktiviert die an den Rezeptorkomplex assoziierte Tyrosinkinase Jak1 über die OH-Gruppe eines Tyrosinrestes. Diese aktiviert unmittelbar die zytoplasmatische Region der gp130 Untereinheit am Tyrosinmotiv via Transphosphorylierung und bildet somit eine Andockstelle für Phosphotyrosin-bindende Proteine [78]. Die als STAT bezeichneten Transkriptionsfaktoren können über ihre SH2-Domänen an die phosphorylierten Tyrosinreste von gp130 andocken [85]. Diese bestehen aus einer DNA-bindenden Domäne, einer Transaktivierungsdomäne am C-Terminus, einer SH3- sowie einer SH2-Domäne, über die die Bindung an Rezeptoren hergestellt werden kann [86,86,87]. Nach Andocken von STAT3 an die signaltransduzierende Untereinheit gp130 wird der Transkriptionsfaktor am Tyrosinrest 705 phosphoryliert. Anschließend bildet das phosphorylierte STAT3 durch reziproke Interaktion der SH2-Domäne mit dem Phosphotyrosin des anderen Partners Homodimere. Diese Dimere dissoziieren vom Rezeptorkomplex ab und wandern Richtung Zellkern. Damit der STAT3-Komplex mit maximaler Transkriptionseffizienz agieren kann, erfolgt eine weitere Phosphorylierung am Serinrest 727 [88]. Nach Translokation in den Nukleus binden sie alleine oder in Kombination mit DNA-bindenden Proteinen an bestimmte Promotorelemente und induzieren somit die Transkription von Zielgenen. Abbildung I.6 zeigt eine schematische Übersicht über die IL-11-induzierte Signaltransduktion über den Jak/STAT Signalweg.

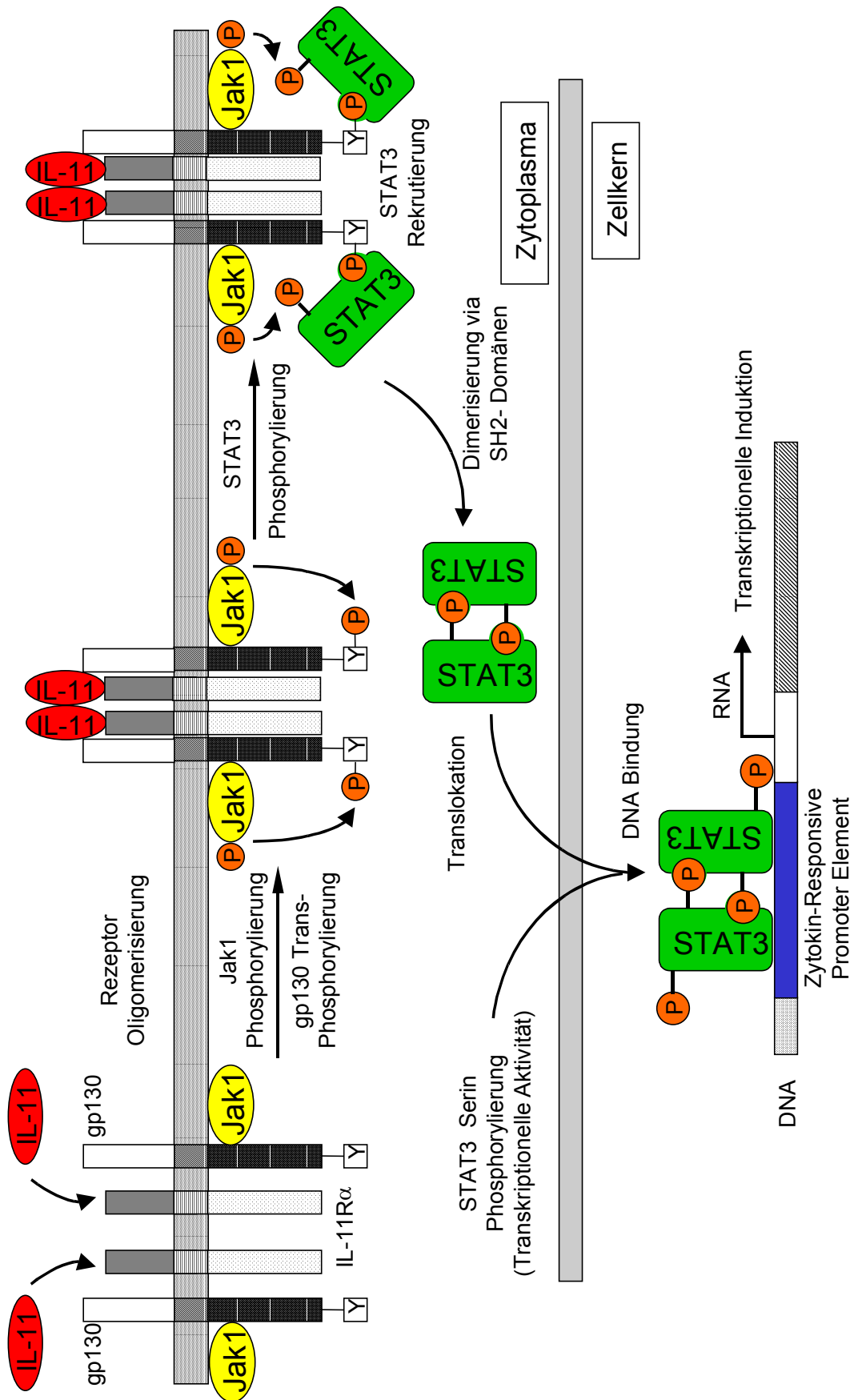


Abbildung I.6: Schematische Darstellung der IL-11 induzierten Signaltransduktion über den Jak/STAT Signalweg. Y = Tyrosinrest, P = Phosphatgruppe (adaptiert nach [48]).

I.7 Arbeitsziele

Das pleiotrope Zytokin IL-11 besitzt neben seiner hämatopoetischen Aktivität ein weites Spektrum an weiteren biologischen Eigenschaften. Die im Tiermodell gefundenen anti-inflammatorischen und zytoprotektiven Effekte bei verschiedenen Arten von Schädigungen und Irritationen der Kolonmukosa empfehlen einen Einsatz bei der Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Jedoch konnten bislang noch keine Zielzellen für eine IL-11-Aktion in der humanen Kolonmukosa identifiziert werden. Durch die Lokalisation IL-11R α positiver Zellen innerhalb der Mukosa des humanen Kolons, die Charakterisierung der Funktionalität und der grundlegenden Mechanismen zur Signaltransduktion sollten die IL-11 induzierten Effekte in diesen *Targetzellen* analysiert werden.

1. Die Zurverfügungstellung des neu generierten, monoklonalen Antikörpers gegen die α -Kette des IL-11Rezeptors ermöglichte erstmals die Untersuchung der Proteinexpression in der humanen Kolonmukosa. Die genaue Lokalisation IL-11R α tragender Zellen innerhalb der Mukosa sollte analysiert werden.
2. Aufbauend auf den Ergebnissen aus den Untersuchungen zur Lokalisation sollte die Expression auf Transkriptions- und Translationsebene in den Zielzellen untersucht werden.
3. Ferner sollte die Zelloberflächenexpression des IL-11R α und der signaltransduzierenden Untereinheit gp130 analysiert werden.
4. Die Untersuchung der IL-11-induzierten Signaltransduktion sollte eine Aussage über die Funktionalität des Rezeptorkomplexes und die molekularen Grundlagen einer IL-11 Stimulation geben.

5. Aufbauend auf die bereits bekannten Daten aus Tiermodellen und Versuchen mit murinen intestinalen Zelllinien sollte das biologische Wirkungsspektrum von IL-11 auf die Zielzellen innerhalb der humanen Kolonmukosa charakterisiert werden. Hierbei sind im Hinblick auf die klinischen Studien bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vor allem mögliche anti-inflammatorische, proliferationsinduzierende oder anti-apoptotische Effekte von IL-11 von Bedeutung. Durch die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die diesen Prozessen zugrunde liegen, erwarteten wir Erkenntnisse über die physiologischen Zusammenhänge der IL-11 Stimulation in akuten und chronisch entzündlichen Situationen in der Kolonmukosa.

II MATERIAL

II.1 Herkunft von Material und Geräten

II.1.1 Material für die Zellkultur

Akkutase	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Amphotericin B	Squibb von Heyden GmbH, München
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ciprofloxacin	Bayer Vital, Leverkusen
Collagen A	Biochrom, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DMEM-Medium	Biochrom, Berlin
DMEM High Glucose Medium	Biochrom, Berlin
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Systems, Aidenbach
Gentamycin	ICN, Meckenheim
Gewebe-Kulturflaschen	Greiner, Solingen
MEM Earle Medium	Biochrom, Berlin
Millicell-CM Einsätze	Millipore, Eschhorn
Multiwell-Kulturplatten 6-, 12-, 24-, 96-well	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin
Nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin	PAN Systems, Aidenbach
Polystyrenröhrchen 15, 50 ml	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin	Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA-Mischung	Biochrom, Berlin
Vitamine (MEM-Vitamine)	Biochrom, Berlin

II.1.2 Geräte für die Zellkultur

Brutschrank Heraeus 6000	Heraeus Sepatech, Hanau
Durchlichtmikroskop	Leitz, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Sterilbank LaminAir HSB 2472 S	Heraeus Sepatech, Hanau
Wasserbad Liquitherm FV	Labora, Mannheim

II.1.3 Material und Geräte für die Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer EPICS XL-MCL	Coulter Immunotech, Krefeld
Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Osterode
Polystyren Röhrchen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Trägerflüssigkeit Isoton [®] II	Coulter Immunotech, Krefeld

II.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

II.2.1 Chemikalien

Die in den Versuchen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme sind mit deren Bezugsquellen in folgender Tabelle zusammengefasst. Wenn nicht anders vermerkt stammten sie von der Firma Merck (Darmstadt) und hatten den Reinheitsgrad p. A.:

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid-Bisacrylamid	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Diethyl Pyrocarbonat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
BCA	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

Complete™ Proteasen Inhibitoren Cocktail	Boehringer, Mannheim
[α - ³² P] dATP	Amersham, Buckinghamshire, GB
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
d’NTP-Mix	PeqLab, Erlangen
DTT	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DNase	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ethanol (70%)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
EDTA	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glyceringelatine	Dako, Hamburg
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
HANKS-Puffer	Biochrom, Berlin
HEPES	Merck, Darmstadt
Hexanucleotid-Mix	Boehringer, Mannheim
Hyperfilm ECL™	Amersham, Buckinghamshire, GB
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Klenowfragment	Boehringer, Mannheim
Magermilchpulver	Glücksklee, Frankfurt a. M.
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
NuSieve Agarose (3:1)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Oligo(dT)-Primer	Promega, Madison, USA
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Phosphat/Citratpuffer-Tabletten	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ponceau S	Fluka, Buchs
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Random-Decamer-Primer	Promega, Madison, USA
Restriktionsendonuklease <i>Pae</i> III	Boehringer, Mannheim
RNase A	Boehringer Mannheim
Saccharose	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt
SDS	Fluka, Buchs
SeaKem LE-Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
TMB-Tabletten	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Tris	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Triton-X100	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Xylencyanol	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

II.2.2 Verbrauchsmaterial

BioMax™ ML Röntgenfilm	Kodak, Rochester, USA
Einmal-Gelkassetten (1,0 mm, 10 well)	Invitrogen BV/Novex, Groningen, NDL
Nitrozellulosemembranen	Invitrogen BV/Novex, Groningen, NDL
0,5 ml PCR Tubes	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipetten	Costar, Cambridge, UK
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Nylon Membran (Hybond™)	Amersham, Buckinghamshire, GB
Petrischalen	Costar, Cambridge, UK
Kanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
Skalpelle	pmf, Köln
Schraubdeckelgefäßen 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Sephadex™ G-50 Säulen	Amersham, Buckinghamshire, GB
Spritzen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
6-well-Mikrotiterplatten	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
48-well-Mikrotiterplatten	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
96-well-Mikrotiterplatten	Greiner Labortechnik, Solingen
Whatman-Papier	Invitrogen BV/Novex, Groningen, NDL
Zellkulturflaschen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg

II.3 Sonstige Geräte

Absorptionsspektrometer	Perkin Elmer, Weiterstadt
Analysenwaage, sartorius analytic A120 S	Sartorius, Göttingen
BioMax TranScreen HE	Kodak, Rochester, USA
Densitometer	Amersham, Buckinghamshire, GB
Elektrophoreseapparatur	Gibco BRL, Eggenstein
ELISA-Reader	MWG Biotech, Denkendorf
RP X-OMAT Processor	Kodak, Rochester, USA
Geltrockner	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Hybridsierungssofen OV1/OV2	Biometra, Göttingen
Millipore Wasser-Filtrationsanlage	Millipore, Eschhorn
pH-Meter	wiss. Tech. Werkst., Weilheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Szintillationszähler	Canberra Packard GmbH, Dreieich
Spectra Fluor Plus Reader	Tecan, Crailsheim
Thermocycler, TRISTAR	Biometra, Göttingen
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
UV-crosslinker, Stratalinker™ 1800	Stratagene, Amsterdam, NDL
Verstärkerfolie, BioMax TranScreen HE	Kodak, Rochester, USA
Videosystem	Visitron Systems, München
Vortex	Heidolph, Kelheim
Waage, Sartorius excellence E1200 S	Sartorius, Göttingen
Western Blot Modul, Xcell™ Mini-Cell	Invitrogen BV/Novex, Groningen, NDL
Zentrifuge, Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Biofuge15	Heraeus Sepatech, Hanau
Zentrifuge, Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech, Hanau

II.4 Reagenziensätze (Kits)

Die in dieser Arbeit verwendeten Reagenziensätze von Biochemikalien, sogenannte Kits, sind mit deren Bezugsquellen in folgender Tabelle zusammengefasst.

ABC-Elite Immunoperoxidase-System	Vector, Burlingame, USA
BIO-RAD Protein-Assay	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Caspase-9 Aktivitäts-Assay (Fluorometrisch)	R&D Systems, Wiesbaden
ECL-Plus™ Western Blotting Detection Kit	Amersham, Buckinghamshire, GB
Gene Checker™ Kit	Invitrogen BV/Novex, Groningen, ND
HotStarTaq™-Master Mix	Qiagen, Hilden
IL-8 ELISA	Endogen, Woburn
MTS-Viabilitätstest	Endogen, Woburn
OMNISCRIP™ Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen RNeasy™ Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen QIAEX II Kit	Qiagen, Hilden
Random Primed DNA Labeling Kit	Boehringer, Mannheim
Re-Blot Plus	
Western Blot Recycling Kit	Chemicon International, Temecula, USA
ULTRAhyb™ Hybridisierlösung	Ambion, Wiesbaden

II.5 Oligonukleotid-Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen:

G3PDH-F	5'-TTA GCA CCC CTG GCC AAG G-3'
G3PDH-R	5'-CTT ACT CCT TGG AGG CCA TG-3'
18S-F	5'-TCA AGA ACG AAA GTC GGA G-3'
18S-R	5'-GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA-3'
IL-11R α -F (RT-PCR)	5'-CGT GAA GCT GTG TTG TCC TG-3'
IL-11R α -R (RT-PCR)	5'-GCT CCT AGG ACT GTC TTC TTC-3'
IL-11R α -F (Sonde)	5'-CGT GAA GCT GTG TTG TCC TG-3'
IL-11R α -R (Sonde)	5'-CCA CAG CAT GTG TGA TCA CC-3'

II.6 Zytokine

Rekombinantes humanes IFN γ	Boehringer, Mannheim
Rekombinantes humanes IL-1 β	Biosource Int., Nivelles, Belgien
Rekombinantes humanes IL-8	Endogen, Woburn
Rekombinantes humanes IL-11	Genetics Institute, Cambridge, USA
Rekombinantes humanes TNF	KNOLL AG, Ludwigshafen

II.7 Standards und Marker

100 bp DNA Leiter	Gibco BRL, Eggenstein
SeaBlue™ Pre-Stained Standard	Invitrogen BV/NOVEX, Groningen, NDL
Multimark™ Multi-Colored Standard	Invitrogen BV/NOVEX, Groningen, NDL
Rainbow™ Multi-Colored Marker	Amersham, Buckinghamshire, GB

II.8 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten, kommerziell erhältlichen Antikörper und Iso-
typkontrollen sind in den folgenden Tabellen unter Angabe des Spenderorganis-
mus, des Konjugats, des Klons und der Herstellerfirma zusammengefasst.

II.8.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Klon	Firma
Kaninchen anti-Human Akt		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Maus anti-Human Aktin	JLA20 (IgG1)	Calbiochem, Bad Soden
Maus anti-Human Bcl-2	100/D5 (IgG1)	Biosource Int., Nivelles, Belgien
Maus anti-Human CD3 / FITC	UCHT1 (IgG1)	Coulter Immunotech, Krefeld
Maus anti-Human CD68 / PE	EMB11Y1/82A (IgG2b)	Pharmingen, Becton Dickinson, Falcon, Heidelberg
Maus anti Human CD117 / PE	95C3 (IgG1)	Coulter Immunotech, Krefeld
Maus anti-Human EP-4	Ber-EP-4 (IgG1)	Dako, Hamburg
Maus anti-Human EP-4 / FITC	Ber-EP-4 (IgG1)	Dako, Hamburg
Maus anti-Human Fibroblastenantigen	AS02 (IgG1)	Dianova, Hamburg
Kaninchen anti-Human gp130		Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA
Kaninchen-anti-Human I κ B- α		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Maus anti-Human IL-11R α	E24.2 (IgG1)	P. C. Heinrich, Universitätsklinikum Aachen
Kaninchen anti-Human IL-11R α		Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Maus anti-Human Jak1	73 (IgG1)	Transduction Laboratories, Lexington, GB
Kaninchen anti-Human Phospho-Akt (Ser473)		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Kaninchen-anti-Human Phospho-Jak1 (Tyr1022/1023)		Biosource Int., Nivelles, Belgien
Kaninchen anti-Human Phospho-STAT1 (Tyr701)		Cell Signaling Technology, Beverly, USA

Kaninchen anti-Human Phospho-STAT3 (Tyr705)		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Maus anti-Human STAT1	1 (IgG1)	Transduction Laboratories, Lexington, GB
Maus anti-Human STAT3	84 (IgG1)	Transduction Laboratories, Lexington, GB

II.8.2 Sekundäre Antikörper

Konjugierte Sekundärantikörper	Firma
Kaninchen anti-Maus IgG-FITC	Dako, Hamburg
Kaninchen anti-Maus IgG-RPE	Dako, Hamburg
Kaninchen anti-Maus IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Ziege anti-Kaninchen IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Protein A-HRP	Calbiochem, Bad Soden
Protein G-HRP	Calbiochem, Bad Soden

II.8.3 Isotypkontrollen

Isotypkontrolle	Firma
Isotyp Maus IgG1	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Isotyp Maus IgG1 / PE	Coulter Immunotech, Krefeld
Isotyp Maus IgG2 / PE	Coulter Immunotech, Krefeld
Isotyp Maus IgG1 / FITC	Dako, Hamburg

II.9 Nährmedien und Puffer

II.9.1 Zellkulturmedien

Medium für HT-29-Zellen

Dulbecco's modified eagle medium (1 g/l Glucose)	500 ml
Fötales Kälberserum (10%)	50 ml
Nicht essentielle Aminosäuren (1%)	5 ml
Natriumpyruvat (1%)	5 ml
Penicillin/Streptomycin (1%)	5 ml

Medium für primäre humane Kolonepithelzellen

MEM Earle Medium (1 g/l Glucose)	500 ml
Fötales Kälberserum (10%)	50 ml
Nicht essentielle Aminosäuren (1%)	5 ml
Natriumpyruvat (1%)	5 ml
Penicillin/Streptomycin (1%)	5 ml
Ciprofloxacin (2 mg/ml)	1-2 ml
Gentamycin (50 mg/ml)	0,5 ml
Amphotericin B (1 mg/ml)	0,5 ml

II.9.2 Puffer und Lösungen

Allgemeine Puffer

PBS (10 x)

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	21,6 g
KH ₂ PO ₄	2 g
ad 1000 ml Aqua bidest.	

TBS (1x)

NaCl (5 M)	20 ml
Tris 0,5 M, pH 8,0	20 ml
ad 1000 ml Aqua bidest.	

IL-8 ELISA

Beschichtungspuffer	0,1 M Natriumhydrogencarbonat
Waschpuffer	0,2% Triton-x 100 in PBS
Blockierlösung	10% FCS in Waschpuffer
TMB-Lösung	1 TMB-Tablette in 5 ml Aqua bidest.
Phosphat / Citratpuffer	1 Tablette in 100 ml Aqua bidest.
Substratlösung	1 Teil TMB-Lösung 1 Teil Phosphat / Citratpuffer 0,03% H ₂ O ₂

Protein-Isolierung**RIPA-Lysepuffer**

Tris-HCl pH 7,4	50 mM
Nonidet P-40	1%
Natriumdeoxycholat	0,5%
SDS	0,1%
PMSF	1 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
NaF ₂	50 mM
1 Tablette Complete™ Proteasen Inhibitoren Cocktail	

CHAPS Lysepuffer

HEPES, pH 7,4	100 mM
CHAPS	0,1%
Saccharose	10%
DTT	1 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
PMSF-Lösung (100 mM)	1 mM
1 Tablette Complete™ Proteasen Inhibitoren Cocktail	

Western Blotting**Tris-Trenngelpuffer**

Tris 1,5 M, pH 8,8	90,8 g
ad 500 ml mit Aqua bidest.	

Tris-Sammelgelpuffer

Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	30 g
ad 500 ml mit Aqua bidest.	
Einstellen des pH Wertes mit 1 M HCl	

SDS (10%)

Natriumdodecylsulfat 10 g
ad 100 ml Aqua bidest.

Ammoniumpersulfat (10%)

Ammoniumpersulfat 100 mg
ad 1ml Aqua bidest.

Laemmli-Probenpuffer (2x)

Tris 0,5 M, pH 6,8 25 ml
Glycerin 20 ml
SDS (10%) 40 ml
 β -Mercaptoethanol 2,0 ml
Bromphenolblau 2 mg
ad 100 ml mit Aqua bidest.

SDS-Polyacryamid-Gel (15%)

Acrylamid-Mix (30%) 10 ml
Tris 1,5 M, pH 8,8 5,0 ml
SDS (10%) 0,2 ml
Ammoniumpersulfat (10%) 0,2 ml
Aqua bidest. 4,6 ml
TEMED 8,0 μ l

Tris-Glycin-Laufpuffer (10 x)

Tris Base 29 g
Glycin 144 g
SDS 10 g
ad 1000 ml Aqua bidest.

Transferpuffer (10 x)

Tris Base 60 g
Glycin 290 g
ad 1600 ml Aqua bidest.

Waschpuffer (TBST)

NaCl (5 M) 40 ml
Tris 0,5 M, pH 6,8 40 ml
Tween 20 2 ml
ad 2000 ml Aqua bidest.

DNA Gelelektrophorese**TAE (50x)**

Tris/Acetat pH 8,0	2 M
EDTA pH 8,0	50 mM

DNA-Ladepuffer

Glycerin	5,47 ml
Bromphenolblau	25 mg
Xylencyanol	25 mg
EDTA (0,5 M)	2 ml
ad 10 ml Aqua bidest.	

Agarosegel

Agarose	1-3% (w/v)
gelöst in TAE (1 x)	

Ethidiumbromidlösung

Ethidiumbromid in Aqua bidest.	0,04%
--------------------------------	-------

Northern Blotting**DEPC H₂O**

Aqua bidest.	500 ml
Diethyl Pyrocarbonat (DEPC)	500 µl
Schütteln, über Nacht inkubieren und 2 h autoklavieren	

MOPS (10 x)

γ-Morpholino-propansulfonsäure (MOPS)	41,9 g
Na-Acetat (wasserfrei)	6,1 g
EDTA	1,9 g
ad 1000 ml DEPC H ₂ O	
Mit NaOH auf pH 7,0 einstellen	

RNA Agarosegel (1%ig)

Agarose	0,7 g	
DEPC H ₂ O		56,7 ml
In Mikrowelle aufkochen und auf 60 °C abkühlen lassen		

MOPS (10 x)	7 ml
Formaldehyd 37%ig	12,6 ml

RNA Ladepuffer (4x)

Deionisiertes Formamid	10 ml
Formaldehyd 37%ig	3,5 ml
MOPS (20 x)	1 ml
Bromphenolblau	Spatelspitze
Xylenolblau	Spatelspitze
Ethidiumbromid	150 µl

SDS 20%ig

Natrium Dodecylsulfat	100 g
ad 500 ml DEPC H ₂ O	

SSC (20 x)

NaCl	175,3 g
Na-Citrat 2x H ₂ O	88,2 g
ad 1000ml DEPC H ₂ O	
pH 7,0 mit 1M HCl einstellen	

Waschlösung A

2 x SSC; 0,1% SDS

SSC (20 x)	50 ml
SDS 20%ig	2,5 ml
ad 500 ml DEPC H ₂ O	

Waschlösung B

0,1 x SSC; 0,1% SDS

SSC (20 x)	2,5 ml
SDS 20%ig	2,5 ml
ad 500 ml DEPC H ₂ O	

III METHODEN

III.1 Zellkultur

III.1.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

III.1.1.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl einer Kultur wurde mikroskopisch mit einem Neubauer-Hämozytometer im Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt. Hierbei wird ein bestimmtes Volumen an Zellsuspension mit Trypanblau gefärbt. Lebende Zellen erscheinen farblos, tote färben sich blau an. Aus einer gut suspendierten Zellkultur wurde ein Aliquot steril entnommen, in eine Kammer des Hämozytometers gefüllt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Dabei wurden vier sich diagonal gegenüberliegende und 16-fach unterteilte Quadrate berücksichtigt. Die Gesamtzellzahl pro ml ergab sich aus der erhaltenen Zellzahl multipliziert mit 2.500 unter Berücksichtigung der Verdünnung.

III.1.1.2 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurde ein spezielles Einfriermedium bestehend aus DMEM mit 20% FCS und 10% DMSO verwendet. Die Zellen wurden abtrypsiniert, zentrifugiert, gezählt und in Einfriermedium resuspendiert (1×10^6 Zellen/ml). Die Zellsuspension wurde in spezielle Einfrierröhrchen gefüllt und über Nacht bei -80°C in einem speziellem Einfrierbehälter, der ein Abkühlen der Zellen um 1°C pro min gewährleistet, eingefroren. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in einen Flüssigstickstofftank überführt.

III.1.1.3 Auftauen von Zellen

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch kurzzeitige Wärmebehandlung des Einfrierröhrchens (37 °C, 2 min). Anschließend wurden die Zellen sofort in vorgewärmtes Zellkulturmedium überführt und einmal abzentrifugiert, um das bei Raumtemperatur als Zellgift wirkende DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden in frischem, 37 °C warmem Zellkulturmedium aufgenommen und in Kulturflaschen überführt.

III.1.2 HT-29 Zelllinie

Hierbei handelt es sich um eine adhärent wachsende, humane Kolonkarzinomzelllinie, die erstmals aus dem Primärtumor einer 44-jährigen Frau isoliert wurde. Die Zellen wurden in DMEM-Medium unter Zugabe von 10% FCS, 1% Natriumpyruvat, 1% nicht-essentiellen Aminosäuren und 1% einer Penicillin/Streptomycin-Mischung kultiviert. Die Kultur erfolgte in einem Brutschrank mit einer Atmosphäre von 37 °C, 10% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit.

Die HT-29-Zellen wurden bei Erreichen der Konfluenz mit Trypsin von den Zellkulturflaschen abgelöst. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin-Lösung (2,5% Trypsin im Verhältnis 1:5 mit PBS verdünnt) inkubiert und für 5-10 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 5 ml Medium aufgenommen, bei 1.200 U/min abzentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes in Medium resuspendiert. 1/10 der Zellen wurde in einer neuen Kulturflasche ausgesät und das Medium alle 3 Tage gewechselt.

III.1.3 Isolierung primärer humaner Kolonepithelzellen

III.1.3.1 Aus Darmresektaten

Die Isolierung der Kolonepithelzellen aus Darmresektaten erfolgte wie von Rogler et al. beschrieben [36]. Die Mukosa der Darmresektate wurde von der Submukosa abpräpariert und mehrmals mit PBS gewaschen, um anhaftenden Schleim und

Blutrückstände weitgehend zu entfernen. Anschließend wurde das Resektat für 15 min bei 37 °C in 10 ml DTT-Lösung in PBS (1mM) geschüttelt und der aufgelöste Schleim mit einer Schere vorsichtig wegpräpariert. Nach wiederholter DTT-Inkubation wurde das Präparat zur Entfernung von DTT-Resten mehrmals mit PBS gewaschen. Die Mukosa wurde für 10 min in 2 mM EDTA in HBSS (pH 8,0) bei 37 °C geschüttelt, bis neben einzelnen Zellen der Lamina propria auch vereinzelt Krypten oder Kryptenteile in der Lösung sichtbar wurden. Der Überstand wurde verworfen und die Mukosa bis zum Auftreten eines gleichbleibend klaren Überstandes mehrmals in 10 ml PBS für jeweils ca. 15 sek gevortext. Die Überstände der Waschschriffe wurden in 15-ml Plastikröhrchen überführt. Intakte Krypten und Kriptenbruchstücke sedimentierten innerhalb 2 min, bevor sie mit einer Pasteurpipette vom Boden des Plastikröhrchens abgenommen wurden. Die Epithelzellfraktionen wurden vereinigt, mit PBS gewaschen und in Zellkulturmedium aufgenommen. Zellzahl und Zellvitalität wurden mittels Trypanblau-Ausschlussmethode bestimmt.

Die Generierung von Einzelzellen aus den isolierten Krypten und Kriptenbruchstücke für die durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgte mit Dispase (1,2 mg/ml in HBSS). Die Zellsuspension wurde für 2 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend kurz gevortext. Die Enzymaktivität der Dispase wurde durch Zugabe von EDTA-Lösung in HBSS (1mM) abgestoppt.

III.1.3.2 Aus Biopsien

Biopsien wurden sofort nach ihrer Entnahme in Zellkulturmedium mit 10% FCS und Antibiotika (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) gegeben und innerhalb von 30 min ins Labor transportiert. Dort wurden sie mit PBS gespült, um anhaftende Serumreste zu entfernen. Anschließend wurden die Biopsien in Eppendorf-Gefäße überführt und in 1 ml EDTA-Lösung (2 mM, pH 8,0) für 20 min bei 37 °C geschüttelt. Der Überstand wurde auf abgelöste Epithelzellen hin untersucht, die Biopsien in neue Eppendorf-Gefäße überführt und nach Zugabe von 500 µl PBS kräftig gevortext. Der Vorgang wurde solange wiederholt, bis keine Epithelzellen mehr im Überstand feststellbar waren. Die Überstände wurden vereinigt, mit PBS gewaschen und mittels Trypanblau-Färbung auf ihre Vitalität untersucht.

III.1.4 Kultur primärer humaner Kolonepithelzellen

Die frisch isolierten Kolonepithelzellen wurden kultiviert wie von Rogler et al. beschrieben [36]. Ca. 1×10^6 frisch isolierte Kolonepithelzellen wurden in 250 μ l MEM Earle Medium resuspendiert und in mit Kollagen A (100 μ g/ml, 30 min) beschichteten Millicell-CM Einsätzen für 6-Loch-Platten ausgesät. Die Einsätze zeichnen sich durch eine durchsichtige und permeable Membran auf der den Kulturplatten zugewandten Seite aus, wodurch eine mikroskopische Beobachtung der Zellen möglich wird. Die Primärzellen wurden bei 10% CO₂ und 37 °C im Brutschrank kultiviert.

Für Kurzzeitstimulationsversuche (bis zu 3h) wurden die frisch isolierten primären humanen Kolonepithelzellen in MEM Earle Medium mit der entsprechenden Stimulationsreagenz resuspendiert, kurz gevortext und bei 1500 U/min für 5 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet garantierte durch die Zell-Zell-Interaktion eine Inhibierung der durch Verlust der Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktion induzierten Apoptose für ca. 3 Stunden.

III.2 Nukleinsäuretechniken

III.2.1 RNA-Isolierung

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgt mit dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen nach Anleitung des Herstellers. Dabei wurde das Zellpellet in 350-600 μ l RLT-Puffer lysiert. Um die Viskosität des Lysats zu reduzieren, wurden die Zellen wiederholt durch eine 20 Gauge Kanüle gezogen. Der Ansatz wurde mit 350-600 μ l 70%igem Ethanol (in DEPC-Wasser) vermischt, auf eine RNeasy *mini spin* Säule übertragen und zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Säule einmal mit 350 μ l Puffer RW1 gewaschen. Um Verunreinigungen mit genomischer DNA zu vermeiden, wurde ein zusätzlicher DNA-Verdau durchgeführt. 70 μ l Puffer RDD und 10 μ l DNase wurden auf die Säule aufgetragen und für 30 min bei RT inkubiert. Danach folgte ein weiterer Waschschrift mit 350 μ l RW1-Puffer. Die Säule wurde in ein

neues Auffangröhrchen überführt und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Die RNA wurde mit 30-50 µl RNase freiem Wasser von den Säulen eluiert.

III.2.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde photometrisch mittels UV-Spektrometrie durchgeführt. Dazu wurde die isolierte Gesamt-RNA 1:100 in DEPC-Wasser verdünnt und die Absorption bei 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) in einer 100 µl Quarzküvette gemessen.

Die Konzentration der RNA (µg/ml) berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration (RNA)} = A_{260} \times 100 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 40$$

Als Maß für die Reinheit der RNA diene das Verhältnis aus der Absorption bei 260 nm zu der Absorption bei 280 nm. Es wurde nur RNA mit einem Quotient aus A_{260}/A_{280} zwischen 1,6 und 2,0 verwendet.

III.2.3 Reverse Transkription von mRNA / cDNA-Synthese

Um die aus Zellen isolierte Gesamt- bzw. Poly(A)-RNA in cDNA umzuschreiben, wurde ein Enzym mit reverser Transkriptase-Aktivität benutzt, wie es im Omniscript™ Kit der Firma Qiagen angeboten wird. Dabei handelt es sich um eine neue heterodimere, rekombinant in E.coli exprimierte, multifunktionale Reverse Transkriptase, mit drei enzymatischen Aktivitäten (RNA-abhängige DNA Polymerase Aktivität, RNase H Aktivität und DNA-abhängige DNA Polymerase Aktivität). Bei der Reversen Transkription wird komplementär zur RNA mit Hilfe von Oligo-dT Primern oder Random-Decamer Primern der cDNA-Strang von 5` nach 3` synthetisiert.

Als Beispiel sei hier ein 20 µl Standardansatz mit 1 µg Gesamt-RNA und Oligo-dT Primern dargestellt:

Gesamt-RNA	2,0 µl
Reverse Transkription Puffer (10x):	2,0 µl
dNTP-Mix (je 5mM):	2,0 µl
Oligo-dT Primer (10 µM):	2,0 µl
RNase-Inhibitor (10 units/µl):	0,5 µl
Omniscript™ Reverse Transkriptase:	1,0 µl
H ₂ O (Nuklease-frei):	10,5 µl

Der Ansatz wurde in ultradünne 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäße gefüllt und unter folgenden Bedingungen im Thermocycler inkubiert:

37 °C	60 min
93 °C	5 min

III.2.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Durch die PCR können Nukleotidsequenzen *in vitro* enzymatisch exponentiell amplifiziert werden. Das Reaktionsprinzip der PCR entspricht der Replikation (Verdopplung) der DNA in der Zelle: eine DNA-Polymerase synthetisiert neue DNA an einer vorhandenen Nukleinsäure-Matrize. Für die PCR wird eine lineare oder zirkuläre Matrize benötigt, deren Sequenz am 5'- und am 3'-Ende bekannt ist, damit zwei Oligonukleotid-Primer abgeleitet werden können. Durch die thermisch stabile Taq-DNA-Polymerase wird der DNA-Abschnitt zwischen den Primern amplifiziert. Die PCR-Reaktion setzt sich aus den folgenden Schritten zusammen (Abbildung III.1):

1. Trennung der Doppelstränge der Template-DNA bei 94 °C (Denaturierung).
2. Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer an die DNA-Matrize bei der berechneten Annealingtemperatur.
3. Kettenpolymerisation zu Doppelsträngen bei 72 °C (optimale Synthesetemperatur der Taq-DNA-Polymerase).

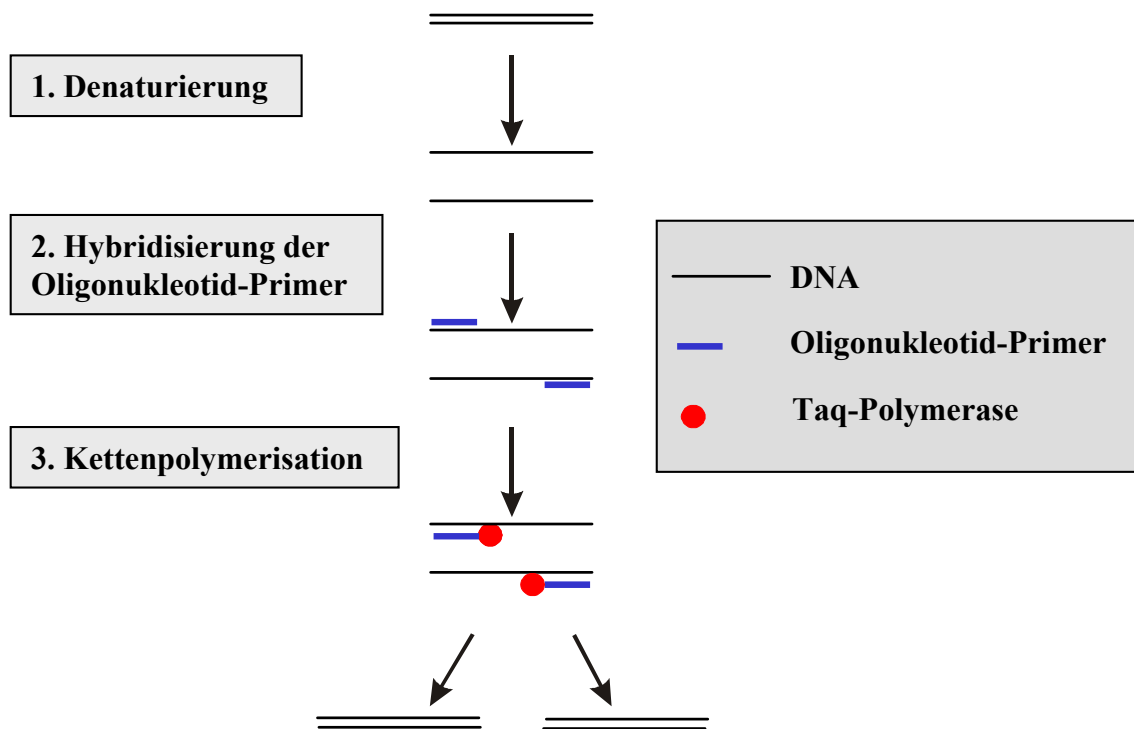


Abbildung III.1: Schematische Darstellung des ersten Zyklus der Polymerase Kettenreaktion (PCR).

Diese Schritte werden in zahlreichen aufeinanderfolgenden Zyklen alternierend durchlaufen. Dabei wird der DNA-Abschnitt zwischen den Primern 2^n -fach (n = Zyklenzahl) amplifiziert. Nach Beendigung des letzten Zyklus erfolgt eine zehnmünütige Inkubation bei 72 °C, um der weniger aktiven Taq-DNA-Polymerase ein Fertigstellen der zuletzt synthetisierten Stränge zu ermöglichen.

Um konstante Bedingungen für mehrere Proben zu gewährleisten, wird ein entsprechender Premix für die jeweiligen Reaktionsansätze vorbereitet. In der Praxis werden 50 µl oder 100 µl Ansätze eingesetzt. Exemplarisch wird die Zusammensetzung eines 50 µl Ansatzes beschrieben. Dazu wurden folgende Komponenten aus dem HotStarTaq™-Master Mix der Firma Qiagen, der bereits die HotStarTaq DNA Polymerase und die dNTPs (je 2,5 mM) im Master Mix beinhaltet, in ein dünnwandiges PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

cDNA (50 ng/μl):	1,0 μl
HotStarTaq™-Master Mix (20 x)	2,5 μl
Oligonukleotid-Primer 1 (10 μM):	1,0 μl
Oligonukleotid-Primer 2 (10 μM):	1,0 μl
H ₂ O	44,5 μl

Der 50 μl Reaktionsansatz wurde im Thermocycler bei folgenden Bedingungen nach initialer 15 minütiger Aktivierung der HotStarTaq bei 95 °C inkubiert:

	G3PDH	IL-11R α (PCR)	IL-11R α (Sonde)
Denaturierung	94 °C / 45 sek	94 °C / 45 sek	94 °C / 45 sek
Annealing	55 °C / 30 sek	57 °C / 30 sek	60 °C / 30 sek
Elongation	72 °C / 30 sek	72 °C / 30 sek	72 °C / 45 sek

Diese Temperaturfolge wurde für 20-35 Zyklen wiederholt. Die Elongation am Ende des letzten Zyklus wurde durch Inkubation für weitere 10 min bei 72 °C vervollständigt und der Reaktionsansatz anschließend auf 4 °C abgekühlt.

III.2.5 Gelelektrophorese

III.2.5.1 Qualitative Auftrennung von DNA

DNA-Moleküle unterschiedlicher Länge können aufgrund ihrer unterschiedlichen Mobilität in Gelen getrennt werden. Man macht sich dabei die negative Gesamtladung der DNA-Doppelhelix zunutze. Sie entsteht durch die unter physiologischen Bedingungen deprotonierten Phosphatgruppen des Rückgrats, weshalb DNA-Fragmente im elektrischen Feld wandern, wobei die elektrophoretische Mobilität umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl ihrer Basen ist.

Zum Auftrennen von DNA wurden abhängig von der Größe der Fragmente 0,8-2,0%ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht und nach dem Abkühlen auf etwa 50 °C wurde Ethidiumbromid hinzugegeben (Endkonzentration 0,5 μg/ml). Als Laufpuffer dient 1x TAE-

Puffer. Die DNA-Proben wurden mit 5x Ladepuffer im Verhältnis 4:1 gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Als Größenstandard wurde eine Probe mit Fragmenten bekannter Länge und Konzentrationen mitgeführt, mit dem auch eine grobe Quantifizierung der DNA-Menge pro Bande möglich war. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 Volt für 2 Stunden. Durch das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid fluoreszierten die Fragmente im UV-Licht orange und konnten somit photographiert werden.

III.2.5.2 Qualitative Auftrennung von RNA

Gesamt-RNA wurde in einem speziellen, Formaldehyd-enthaltenden Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Durch die erhöhte Temperatur bei der Denaturierungsreaktion und durch Formaldehyd wurden intramolekulare Wasserstoff-Brückenbindungen und damit Sekundärstrukturen in der RNA aufgelöst.

Zur Auftrennung der mRNA und zur Überprüfung der RNA-Qualität wurde diese in einem 1%igem Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Für 50 ml wurden dazu 0,5 g hochreine Agarose in 42,5 ml DEPC-H₂O und 2,5 ml MOPS (20x) aufgekocht und auf 60 °C abgekühlt. Dann wurde 5,0 ml Formaldehydlösung (30%) hinzu gegeben und in eine vorbereitete Gelkammer gegossen. Ein Teil der RNA (10-20 µg Gesamt-RNA) wurde mit 4 Teilen RNA-Ladepuffer gemischt, 20 min bei 65 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die so vorbereiteten Proben wurden in die Taschen des erkalteten Gels pipettiert und mit 1x MOPS-Lösung als Laufpuffer bei 40 V für 4-6 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt.

Das RNA-Gel wurde nach dem Lauf für 45 min in Färbelösung (250 ml H₂O + 10 µl EtBr) geschwenkt und mit angelegtem Lineal fotografiert. Um das Ethidiumbromid und das Formamid aus dem Gel zu waschen, wurde es eine Stunde in H₂O leicht geschüttelt, dabei wurde das Wasser alle 15 min ausgetauscht.

III.2.6 cDNA Verdau

Die doppelsträngige (ds) amplifizierte IL-11R α cDNA wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *Pae* III in zwei Fragmente gespalten, um die Spezifität der vorausgegangenen RT-PCR zu validieren. Die amplifizierte IL-11R α cDNA beinhaltet eine *Pae* III Schnittstelle. Der Verdau wurde in folgendem Standardansatz durchgeführt:

ds cDNA (0,5 – 2 μ g)	43,5 μ l
10x <i>Pae</i> III Restriktionspuffer (10 x)	5,0 μ l
<i>Pae</i> III (10 units/ μ l)	1,5 μ l

Das Gemisch wurde bei 37 °C für 1,5 h inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit einer 20x EDTA/Glykogen Lösung abgestoppt. Aliquots der cDNA Amplifikate vor und nach dem Verdau wurden entnommen und auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

III.2.7 Northern Blotting

Diese Technik wurde verwendet, um aus Gesamt-RNA (bis zu 20 μ g) Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Sonden durchführen zu können. Die Gesamt-RNA wurde in einem RNA Agarosegel (1%ig) elektrophoretisch unter denaturierenden Bedingungen (siehe III.2.5.2) aufgetrennt, auf eine Nylonmembran mittels Kapillarkraft transferiert, fixiert und mit einer radioaktiv-markierter cDNA-Sonde hybridisiert.

III.2.7.1 RNA-Transfer durch Northern Blot

Zum Transfer der RNA wurde eine Nylonmembran mit DEPC behandeltem H₂O benetzt und 15 min in 20x SSC äquilibriert. In einer mit 20x SSC gefüllten Wanne wurden über eine quergelegte Platte zwei Lagen Whatmanpapier gelegt, dessen Enden in die 20 x SSC-Lösung eintauchten und so die Flüssigkeit aufsaugen konnten. Das Agarosegel wurde mit den Taschen nach unten blasenfrei auf das feuchte Papier gelegt. Die benetzte Nylonmembran wurde ohne Luftblasen auf

das Gel geschichtet und mit feuchtem Whatmanpapier gleicher Größe bedeckt. Den Kapillartransfer erreicht man durch einen etwa 15 cm hohen Stapel aus trockenem Zellulosepapier. Der Blot wurde mit einem Gegenstand gleichmäßig beschwert (Abbildung III.2).

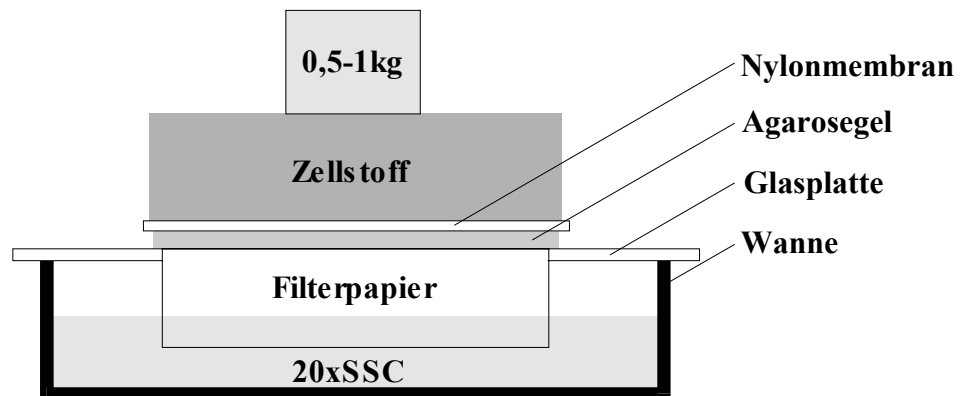


Abbildung III.2: Schematischer Aufbau eines RNA-Kapillarblots.

Der Transfer erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die RNA auf der Nylonmembran durch Bestrahlung mit UV-Licht (1200 μ Joules \times 100, UV Stratalinker 1800) kovalent mit der Membran vernetzt und die Vollständigkeit des Transfers unter UV-Licht kontrolliert. Die fixierte RNA wurde zur Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden eingesetzt.

III.2.7.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

In Agarosegel aufgetrennte DNA wurde mit Hilfe des QIAEX II Kit der Firma Qia-gen aus dem Gel eluiert und zur Herstellung von Sonden für den Northern Blot eingesetzt. DNA-Fragmente können bei dieser Methode unter Hochsalz-Bedingungen an eine Silikon-Matrix (QIAEX Silica-Gel) gebunden und unter Niedersalz-Bedingungen (Wasser oder TE-Puffer) wieder eluiert werden. Bei der Isolation wurde die relevante Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Gelstück wurde mit 1 ml Puffer QX 1 und 10 μ l QIAEX II versetzt und bei 50 °C geschmolzen. Anschließend wurde das QIAEX II abzentrifugiert, einmal mit 0,5 ml Puffer QX 1 und zweimal mit 0,5 ml Puffer PE gewaschen. Das QIAEX II Pellet wurde 15 min luftgetrocknet, in 20 μ l

H₂O resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde abgenommen und zur Sondenherstellung eingesetzt.

III.2.7.3 Markierung von cDNA-Sonden

Für die radioaktive Markierung von cDNA-Sonden wurde der *Random Primed DNA Labeling Kit* der Firma Boehringer verwendet. Dieser basiert auf der Hybridisierung einer Mischung von Hexanukleotiden aller möglichen Basensequenzen an die zu markierende cDNA. In einer Auffüllreaktion, katalysiert durch das Klenow-Enzym aus *E.coli*, wurde die einzelsträngige DNA zum Doppelstrang ergänzt. Dabei wurden drei nicht radioaktiv markierte dNTP (hier dTTP, dGTP und dCTP) und ein in α -Stellung mit [³²P] markiertes dATP eingesetzt, wodurch die cDNA radioaktiv markiert wurde. In einem 1,5 ml Schraubdeckelgefäß wurde folgender 20 μ l Ansatz vorbereitet:

dsDNA (25 ng)	1,0 - 9,0 μ l
Hexanukleotid-Mix (10x)	2,0 μ l
H ₂ O	ad 11,0 μ l

Der Ansatz wurde 10 min bei 95 °C inkubiert, um die dsDNA zu denaturieren und anschließend unmittelbar auf Eis abgekühlt. Folgende Komponenten wurden dann zur Markierungsreaktion zugegeben:

dXTP Mix (10 mM)	1,0 μ l
10x Reaktionspuffer	2,0 μ l
Klenowfragment	1,0 μ l
[α - ³² P] dATP	5,0 μ l

Die Markierung erfolgte für 30 min bei 37 °C. Die Reaktion wurde mit 2 μ l 0,2 M EDTA (pH 8) abgestoppt und auf Eis inkubiert.

III.2.7.4 Abtrennung freier Nukleotide

Um freie, nicht eingebaute Nukleotide abzutrennen, wurde der Reaktionsansatz über Sephadex[™] G-50 Säulen (*NICK[™] columns*) aufgereinigt. Die Matrix dieser Säulen enthält mikroskopisch kleine Kügelchen, deren Oberfläche kleine Moleküle ins Innere passieren lässt, Makromoleküle aber ausschließt. Diese passieren daher beim Durchfluss durch die Säule nur das kleinere Ausschlussvolumen und werden so von den nicht eingebauten Nukleotiden abgetrennt. Hierzu wurden die Säulen mit 2 ml TE-Puffer (pH 8,0) gewaschen und die 20 µl der Markierungsreaktion auf sie Säule pipettiert. Nicht eingebautes [α -³²P] dATP wurde durch Zugabe von 380 µl TE-Puffer abgetrennt. Die markierte Sonde wurde danach durch Zugabe von 400 µl TE-Puffer eluiert. Der Einbau von [α -³²P] dATP wurde durch Messung am Szintillationszähler kontrolliert.

III.2.7.5 Hybridisierung und Waschen

Die auf der Nylonmembran immobilisierte RNA kann mit spezifischen, radioaktiv markierten cDNA-Sonden hybridisiert werden. Die cDNA- oder Oligonukleotid-Sonden finden komplementäre Bereiche in der fixierten RNA und bilden unter bestimmten Salz- und Temperaturbedingungen stabile Hybride. Die Prähybridisierung der RNA-Blots zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen an der Nylonmembran und der geblotteten RNA, erfolgte für 30 min in ULTRAhyb[™] Hybridisierungslösung bei 42 °C. Die markierten, aufgereinigten cDNA-Sonden wurden 10 min auf 95 °C erhitzt, kurz im Eisbad abgekühlt und zum Prähybrisierungsgemisch gegeben. Pro Hybridisierung wurden zwischen 1×10^5 – 1×10^6 cpm/ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Der Blot wurde anschließend über Nacht bei 42 °C im Hybridisierungssofen inkubiert.

Die Entfernung unspezifisch gebundener Radioaktivität erfolgte mittels Waschen der hybridisierten Nylonmembranen. Zunächst wurde die Membran 5 min bei RT in 20 ml 2x SSC gewaschen. Anschließend wurde die Membran zweimal bei 42 °C für 10 min in 20 ml Waschlösung A (2x SSC / 1% SDS) geschwenkt. Zwei weitere Waschschrte für 15 min mit erhöhter Stringenz mit Waschlösung B (0,1 x SSC, 0,1% SDS) wurden durchgeführt, bis die Messung mit dem Handmonitor eine Ak-

tivität im Toleranzrahmen (ca. 0,6-1,0 cpm) ergab. Nach jedem Waschgang wurde die Strahlungsaktivität überprüft. Gegebenenfalls wurde der Waschvorgang bei Erreichen der gewünschten Intensität abgebrochen. Gewaschene Nylonmembranen wurden in Plastikfolie (*hybridization bags*) eingeschweißt und zur Detektion der spezifisch hybridisierten Radioaktivität in der Autoradiographie eingesetzt.

Um Blots erneut hybridisieren zu können, musste die spezifische DNA-Sonde von der Membran entfernt (*gestrippt*) werden. Dazu wurde die Membran 20 min in 100 ml Waschlösung B (0,1 x SSC; 0,1% SDS) gekocht und nach dem Abkühlen kurz in 2 x SSC geschwenkt. Zur Kontrolle wurde der Blot mit dem Handmonitor gemessen und eine Autoradiographie durchgeführt.

III.2.7.6 Autoradiographie

Zur Detektion radioaktiver Signale mit einer Strahlungsaktivität von $> 0,6$ cpm wurde in einer Röntgenkammer auf den Blot oder das Gel ein BioMax™ ML Röntgenfilm aufgelegt und für 1–7 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt. Danach wurde der Film entwickelt am RP X–OMAT Processor entwickelt.

Zur Verstärkung der Signale bei Northern Blots mit einer geringen Strahlungsaktivität von 0,05 - 0,6 cpm wurde die Verstärkerfolie BioMax TranScreen HE zusammen mit dem BioMax MS Film eingesetzt.

III.3 Protein-Nachweismethoden

III.3.1 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ermöglicht den Nachweis und die Lokalisation bestimmter zellulärer Oberflächenmarker oder intrazellulärer Proteine in Geweben und Zellen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Allen immunhistochemischen Methoden liegt die Fähigkeit immunreaktiver Antikörper zugrunde, zugehörige Antigene zu erkennen und daran mit einer hohen Affinität zu binden. Die Antigen-Antikörper-Bindung kann hierbei durch verschiedene direkte oder indirekte Markierungsverfahren sichtbar gemacht werden.

III.3.1.1 Gefrierschnitte

Für den immunhistochemischen Nachweis gewebespezifischer Antigene wurden Präparate mit 5 µm Schichtdicke bei –25 °C im Kryotom geschnitten und auf unbeschichtete Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden anschließend für fünf Minuten in eiskaltem Aceton oder 100%igem MeOH fixiert, kurz in Wasser gespült und bei Raumtemperatur vollständig getrocknet. Bis zur immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte bei –80 °C aufbewahrt.

III.3.1.2 Färbungen mit der DAB-Methode

Das ABC-Elite Immunoperoxidase-System der Firma Vector wurde als Standardmethode für die Immunhistochemie von Darmgewebe verwendet. Die Färbung mit dem Reagenz 3-3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) ergibt einen braunen Farbton. Vor der Färbung wurden die Objektträger auf Raumtemperatur gebracht und die Schnitte mindestens 15 min in 1x TBS rehydriert. Alle folgenden Inkubationen wurden, sofern nicht anders angegeben, in einer feuchten Inkubationskammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurden die Gewebeschnitte in 1% BSA/PBS für 30 min inkubiert. Der antigenspezifische, primäre Antikörper wurde in

1%iger BSA/PBS Lösung verdünnt. 100 µl Primär-Antikörperlösung wurden auf den Gewebeschnitt pipettiert und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle diente jeweils eine subklassenspezifische Isotypkontrolle. Anschließend wurden die Gewebeschnitte 3 mal für 5 min in 1x TBS gewaschen. Um die Aktivität der endogenen Peroxidasen der Zellen im Gewebeschnitt zu neutralisieren wurde der Objektträger für 30 min in 0,3%iger H₂O₂ - Lösung inkubiert. Danach wurden die Gewebeschnitte 3 mal für 5 min in 1x TBS gewaschen. Das Gewebe wurde anschließend mit einem biotinylierten, Sekundärantikörper, der gegen den antigenspezifischen, primären Antikörper gerichtet war, in 1%iger BSA/PBS Lösung für 30 min inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Gewebeschnitte 3 mal für 5 min in 1x TBS gewaschen und mit 100 µl der vorbereiteten Streptavidin-Peroxidase-Lösung des ABC-Kits weitere 30 min inkubiert. Danach wurden die Gewebeschnitte 3 mal für 5 min in 1x TBS gewaschen. Nach diesem Waschschritt wurden die Zellen mit 100 µl Peroxidase-Substratlösung versetzt und unter visueller Kontrolle bei Raumtemperatur inkubiert. Für die DAB-Färbung wurden die Gewebeschnitte mit einer Peroxidase-Substratlösung aus 0,03% DAB und 0,003% H₂O₂ behandelt. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wurden die Objektträger 5-10 min mit Wasser gespült um die Färbereaktion abzustoppen. Um Bestandteile des nicht gefärbten Gewebes sichtbar zu machen, wurden die Gewebeschnitte mit Hämatoxylinlösung gegengefärbt, um auf diese Weise die Zellkerne blau zu markieren. Hierfür wurden die Objektträger 20 Sekunden in eine Hämatoxylinlösung getaucht und anschließend 10 min unter Leitungswasser gespült, bis sich keine Entfärbung des Schnittes mehr ergab. Die Schnitte wurden anschließend bei Raumtemperatur getrocknet, mit Glyceringelatine und einem Deckgläschen versiegelt und lichtmikroskopisch beurteilt.

III.3.2 Western Blotting

Mit Hilfe des sogenannten Western Blotting ist es möglich, Proteine aufzutrennen und anschließend zu identifizieren. Die Proteine werden in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch die Behandlung mit SDS erhalten die Proteine eine negative Ladung. Der Zusatz von β -Mercaptoethanol spaltet die intramolekularen Disulfidbrücken durch Denaturierung. Die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine hängt also nur noch von der Größe des Moleküls und der Porengröße des dreidimensionalen Gel-Netzwerks ab. Nach der elektrophoretischen Auftrennung werden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert („geblottet“) und können mit spezifischen Antikörpern markiert und mittels einer Chemoluminiszenz-Reaktion sichtbar gemacht werden.

III.3.2.1 Zytosolpräparation

Die adhärennten Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, um Reste des im Medium enthaltenen FCS zu entfernen und anschließend je nach Lyse-Bedingungen, entweder in 100-200 μ l RIPA- (nur für Phosphorylierungsnachweise) oder CHAPS-Lysepuffer resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte eine zusätzliche mechanische Lyse der Zellen durch Abschaben vom Boden der Kulturflasche mit einem sogenannten *cell-scraper*. Das Gesamtproteinlysate wurde anschließend mehrmals für 3 Sekunden Ultraschall behandelt, um eine vollständige Lyse zu gewährleisten und eventuelle DNA-Protein Wechselwirkungen zu beseitigen. Das erhaltene gesamtytosolische Lysat wurde für 10 min bei 15.000 U/min bei 4 °C zentrifugiert und der die zytosolischen Proteine erhaltende, klare Überstand in ein neues vorgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

III.3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der isolierten Proteine wurde photometrisch mit Hilfe des BIO-RAD Protein Assay bestimmt. Der Test beruht auf der Methode von Bradford, bei der die Bindung von *Coomassie brilliant blue G250* an Proteine das Absorptionsmaximum von 465 nm (ohne Protein) zu 595 nm (mit Protein) verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Probenlösung.

Absolute Werte für den Proteingehalt wurden durch die Messung einer Verdünnungsreihe einer BSA-Standardlösung bekannter Konzentration ermittelt. Durch Auftragung der Absorption bei 595 nm gegen den Proteingehalt der Verdünnungsreihe erhält man eine Eichgerade, aus der Gesamtproteingehalt der Probe ermittelt werden konnte. Die Probenlösungen wurden hierfür im Verhältnis 1:1000 verdünnt eingesetzt, mit 200 µl Bio-Rad Farbstoff versetzt und der 1,0 ml Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption des gebildeten Komplexes konnte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen und anschließend die Proteinkonzentration der Probenlösung aus der Standardkurve berechnet werden.

III.3.2.3 Vorbereitung der Proben

30-75 µg isoliertes Gesamtprotein wurden mit dem entsprechenden Lysepuffer auf ein Volumen von maximal 20 µl eingestellt und mit dem gleichem Volumen 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt. Die äquivalenten Proteinmengen wurden anschließend bei 95 °C für 5 min denaturiert und nach kurzer Zentrifugation in die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt.

III.3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der denaturierten Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das XCell II™ Mini-Cell Modul (Novex-Kammer) der Firma Invitrogen BV/Novex verwendet. Hierfür wurden Einmal-Gelkassetten benutzt, in denen ein für den Auftrennungsbereich geeignetes SDS-Polyacrylamid-Gel (6-15%) mit einem pH-Wert von 8,8 gegossen wurde. Das Trenngel wurde mit einem 5%igen Sammelgel mit einem pH-Wert von 6,8 überschichtet und der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach ca. 45 min Polymerisation wurde der Probenkamm vorsichtig entfernt und die restliche Sammelgel-Lösung mit Aqua bidest. abgespült. Die fertigen Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Novex-Kammer mit Laufpuffer (1 x) befüllt.

In die Geltaschen gefüllte Proben ließ man bei 50-70 V (12,5 mA pro Gel) in das Sammelgel einwandern und erhöhte bei Erreichen des Trenngels die Spannung auf 120 V (18 mA). Die Laufzeit betrug ca. 1,5 Stunden, bis die Laufmittelfront das untere Ende des Gels erreicht hat. Ein sogenannter *Marker* wurde stets als Größenstandard für die zu detektierenden Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel mitgeführt.

III.3.2.5 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran (Blotten)

Proteine können durch einen Transfer aus SDS-Polyacrylamidgelen auf geeignete Membranen übertragen werden. Der Proteintransfer erfolgte ebenfalls mit dem XCell II™ Mini-Cell Blot-Modul mittels Tank-Blotting-Technik. Hierfür wurde eine Sandwich-Anordnung aus Schwämmen, Whatman-Filterpapieren, dem Polyacrylamid-Gel und der Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm) für den Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran hergestellt. Das Polyacrylamid-Gel wurde nach dem Aufbrechen aus der Einmal-Gelkassette entnommen, mit einem Skalpell das Sammelgel abgeschnitten und auf die Größe des Whatman-Filterpapiers zurechtgeschnitten. Auf die Kathodenseite des Blot-Moduls wurden zwei mit Transferpuffer getränkte Schwämme gelegt. Darauf folgte eine Anordnung aus einer Lage Whatman-Filterpapier, das Polyacrylamid-Gel, der Membran, einer weiteren Lage Whatman-Filterpapier und zwei weiteren in Transferpuffer

getränkten Schwämmen. Beim Aufbau wurde darauf geachtet, dass sich zwischen den einzelnen Schichten keine Luftblasen befanden, da sonst nur ein unvollständiger Transfer erfolgt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei 0,8 mA/cm² Gelfläche für die Dauer von einer Stunde.

III.3.2.6 Färbung der Membran mit Ponceau S

Um den vollständigen Transfer der Proteine vom Polyacrylamid-Gel auf die Nitrozellulosemembran zu kontrollieren wurde diese mit Ponceau S angefärbt. Die Nitrozellulosemembran wurde für 30 sek in Ponceau S Lösung geschwenkt und anschließend solange in Aqua bidest. entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar wurden. Die Intensität der sichtbaren Proteinbanden konnten ebenfalls als Beladungskontrolle des Polyacrylamid-Gels benutzt werden. Im Anschluss daran wurde die Nitrozellulosemembran durch Schwenken in Waschpuffer restlos entfärbt.

III.3.2.7 Immundetektion der Proteine

Zur Immundetektion der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4 °C oder 1h bei RT in Blockierlösung (5%iger Magermilchlösung oder 5%ige BSA-Lösung in Waschpuffer) belassen, um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen und auf diese Weise unspezifische Bindungsstellen auf ein Minimum zu reduzieren.

Anschließend wurde die Membran kurz in Waschpuffer geschwenkt und die Inkubation mit dem in Blockierlösung verdünnten Primärantikörper erfolgte für mindestens 1 Stunde bei RT unter leichtem Schütteln. Die Membran wurde daraufhin für 3 x 2 min und 3 x 10 min in Waschpuffer kräftig geschüttelt. Der gegen den Primärantikörper gerichtete, in Blockierlösung verdünnte Sekundärantikörper (HRP-gekoppelt) wurde dann für weitere 60 min unter leichtem Schütteln bei RT auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Vor der Entwicklung mit dem *ECL-Plus™ Western Blotting Detection Kit* wurde die Membran für 3 x 2 min und anschließend für 3 x 20 min in Waschpuffer kräftig geschüttelt, um eventuell noch anhaftende, nicht gebundene Antikörper restlos zu entfernen. Die noch mit Detektionslösung befeuchtete Membran wurde in Klarsichtfolie verpackt und mit der Proteinseite nach

oben in eine Röntgenfilmkassette eingelegt. Anschließend wurde ein Hyperfilm ECL™ für 1-15 min bei Rotlicht in der Dunkelkammer bis zur gewünschten Intensität aufgelegt und der Film entwickelt.

III.3.2.8 Stripping der Nitrozellulosemembran

Nach erfolgter Immundetektion des Zielproteins auf der Nitrozellulosemembran konnte diese für weitere Antikörperinkubationen verwendet werden. Hierfür wurden durch ein sogenanntes *Stripping* der Membran die gebundenen Antikörper durch eine 10-minütige Inkubation mit einem speziellen *Western Blot Recycling Kit* entfernt. Anschließend wurde die Membran 1 h in Waschpuffer geschwenkt.

III.3.3 IL-8 ELISA

Im *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) wurde die IL-8 Sekretion der Kolonepithelzellen quantitativ erfasst. Hierfür wurde eine 96-well-Mikrotiterplatte mit 100 µl/well Beschichtungspuffer, dem 2 µg/ml anti-IL-8 Antikörper zugesetzt waren, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die noch unbesetzten freien Bindungsstellen des Kunststoffes mit 300 µl/well Blockierungspuffer 1 Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach dreimaligem Spülen der Platte mit Waschpuffer wurden 100 µl/well des Zellkulturüberstandes sowie der Standardverdünnungsreihe in die Vertiefungen pipettiert. Die Platte wurde 2 Stunden bei RT inkubiert, dreimal mit Waschpuffer gewaschen und 100 µl/well des in Waschpuffer verdünnten Sekundärantikörpers (100 ng/ml anti-Human IL-8 biotinyliert) auf die Mikrotiterplatte gegeben. Nach weiteren 2 Stunden Inkubation bei RT wurde die ELISA-Platte wiederum dreimal gewaschen, bevor 100 µl/well des Streptavidin-HRP-Konjugates für 20 min zupipettiert wurden. Nach erneutem Waschen wurden je 100 µl *TMB substrate solution* zugegeben und die ELISA-Platte bei 37 °C für ca. 30 min bis zur gewünschten Intensität inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 µl *stop solution* abgebrochen. Entstandene Farbkomplexe wurden anschließend am ELISA-Reader bei 450 nm vermessen. Die Auswertungen der Messungen wurden mit der Software *Softmax for Windows* (Version 2.35) durchgeführt.

III.3.4 Fluorometrische Messung der Caspase-9 Aktivität

Zur Bestimmung der Caspase-9 Aktivität in Kolonepithelzellen wurde der fluorometrische Caspase-9 Aktivitäts-Assay der Firma R&D Systems verwendet. Hierfür wurden 50 µg zytosolisches Gesamtproteinextrakt gemäß dem Protokoll des Herstellers in einer 96-well-Platte auf die Konzentration der gespaltenen, aktivierten Caspase-9 hin untersucht. Diese ist proportional zu der auftretenden, von der aktivierten Caspase-9 spezifisch gespaltenen Fluoreszenz des Substrates LEHD-AFC. Die Detektion der Fluoreszenz des gespaltenen Substrates erfolgte im *Fluoreszenzreader* bei einer Emissionswellenlänge von 505 nm.

III.3.5 MTS-Viabilitätstests

Die Viabilität der Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen an rek. IL-11 inkubiert wurden, wurde mit Hilfe von MTS-Tests überprüft. Das Testprinzip ist ein kolorimetrischer Assay, der darauf beruht, dass ein zu den Zellen zugegebenes farbloses Tetrazoliumsalz (MTS, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy-phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) nur von lebendigen Zellen zu einem intensiv gefärbten Formazan reduziert wird. Für diese Reduktion ist die Zugabe von Phenazin-methosulfat (PMS) als Elektronenakzeptor nötig. Die durch die Reduktion entstehende Farbentwicklung kann spektrometrisch bestimmt werden. Die gemessene Absorption ist proportional zur Anzahl der lebendigen Zellen in der Probe, und somit ein Parameter für die Zellviabilität und die Zellproliferation. HT-29-Zellen wurden wie bereits beschrieben in verschiedenen Zelldichten in 96-well-Mikrotiterplatten (10-100.000 Zellen/well) ausgesät und wurden entweder unbehandelt belassen oder mit ansteigender IL-11 Konzentration inkubiert. Nach 48 h wurde die Vitalität der Zellen bestimmt. Dazu wurden die Überstände aus den Wells abgesaugt und durch 200 µl RPMI (ohne Phenolrot) ersetzt. Zu der MTS Stock-Lösung (1mg MTS / 1ml PBS) wurden unmittelbar vor Ansetzen des Tests 50 µl PMS-Lösung zugegeben. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden nun 10 µl der frisch angesetzten MTS/PMS-Lösung pipettiert. Die Platten wurden für 2 h bei 37 ° C inkubiert und die Absorption anschließend bei einer Wellenlänge von 490 nm am *ELISA-Reader* gemessen. Als Kontrollen wurden unstimulierte Zellen verwendet.

III.4 Durchflussszytometrie

Die Durchflussszytometrie gestattet eine multiparametrische Zellanalyse. Durch Detektion des Streulichtverhaltens und der Fluoreszenz von Einzelzellen, die über spezifische Rezeptoren, Proteine oder Marker (membranständig oder intrazellulär) fluoreszenzmarkiert wurden, können chemische und physikalische Eigenschaften durch die kombinierte Interpretation der erfassten Daten erlangt werden. Dabei können sehr große Zellzahlen innerhalb kürzester Zeit (bis 1.000 Zellen pro Sekunde) analysiert werden.

III.4.1 Optisches System und Lichtdetektion

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Durchflussszytometer, Coulter EPICS XL-MCL (Coulter Immunotech, Krefeld) werden die Zellen in einer Suspension vorgelegt, über eine Kapillare angesaugt und mit einer Probenflüssigkeit (isotonische Kochsalzlösung) vermischt. Durch einen Geschwindigkeitsgradienten wird der Probenstrom zur Mitte der Düse hin stärker beschleunigt. Diese sogenannte hydrodynamische Fokussierung bewirkt, dass eine Verwirbelung vermieden wird und die einzelnen Zellen in einem Flüssigkeitsstrom nacheinander eine Messküvette passieren, auf die ein Argonlaserstrahl mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm trifft. Über ein System von dichroitischen Spiegeln, optischen Linsen und Filtern werden gestreutes Licht und Fluoreszenzlicht zu Photomultipliern (PMT) weitergeleitet und detektiert. Abbildung III.3 zeigt den schematischen Aufbau des optischen Systems des Durchflussszytometer EPICS XL-MCL.

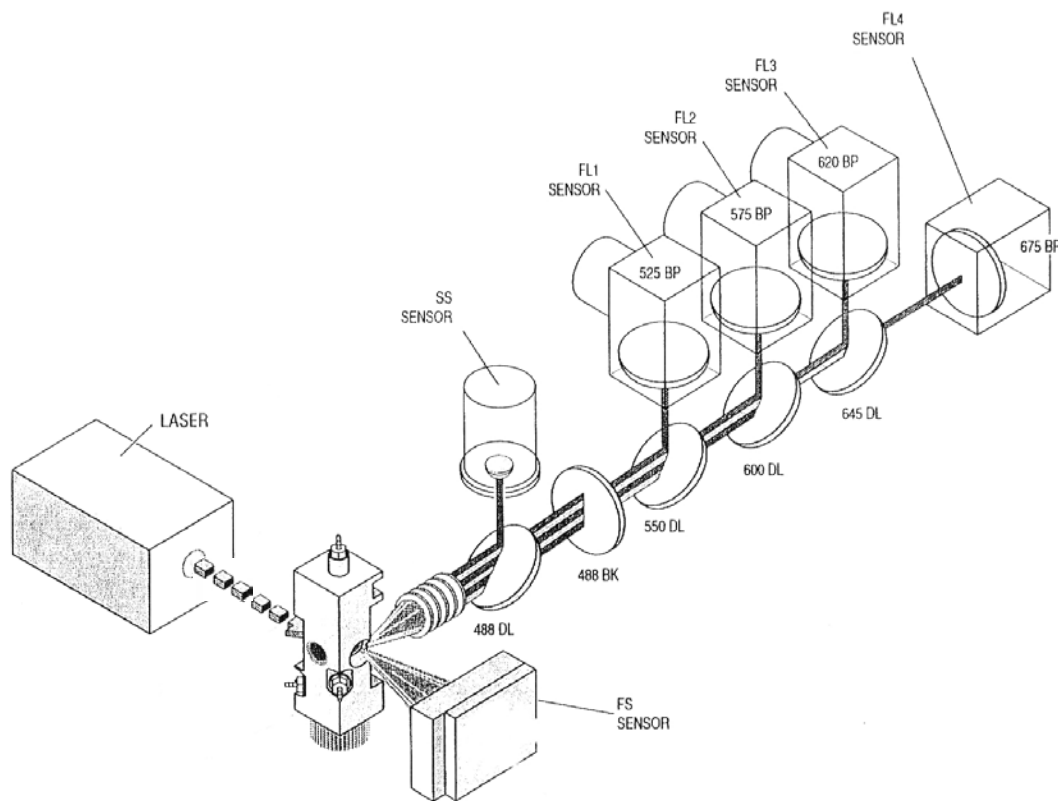


Abbildung III. 3: Schematische Darstellung des optischen Systems des Durchflusszytometers Coulter EPICS XL-MCL (nach dem „user manual“ der Firma Coulter Immunotech, Krefeld). Vorwärtsstreulicht (FS), Seitwärtsstreulicht (SS), dichroitischer Spiegel (DL), Filter (BK) und Bandpassfilter (BP) in nm.

Die Photodiode für das Vorwärtsstreulicht (FSC) detektiert das Licht, das im Winkel zwischen $1,5^{\circ}$ - 10° in Strahlenrichtung von der Zelle gestreut wird. Die Intensität des Vorwärtsstreulichtes gibt Auskunft über die Größe der Zellen, so dass man mit Hilfe dieses Parameters eine Größendiskriminierung vornehmen kann. Das Seitwärtsstreulicht (SSC) wird orthogonal zum Strahlengang detektiert (in einem Raumwinkel von 4°) und vom Fluoreszenzlicht ausgekoppelt. Das SSC-Signal ist abhängig von der inneren Struktur der Zelle und liefert ein Maß für die Granularität der Zelle. Die Fluoreszenzemission wird wie das Seitenstreulicht im 90° -Winkel zur Strahlenrichtung des Lasers gesammelt und nach Abtrennung mit Hilfe von dichroitischen Spiegeln und Interferenzfiltern in vier Spektralbereiche spezifischer Wellenlängen aufgetrennt:

Fluoreszenz 1 (FL1):	505-545 nm, mit 525 nm Bandpassfilter
Fluoreszenz 2 (FL2):	555-600 nm, mit 575 nm Bandpassfilter
Fluoreszenz 3 (FL3):	605-645 nm, mit 620 nm Bandpassfilter
Fluoreszenz 4 (FL4):	650-725 nm, mit 675 nm Bandpassfilter

III.4.2 Interpretation und Auswertung der Daten

Ausgangspunkt für die Auswertung der erhaltenen Daten ist eine zweidimensionale Auftragung, der sogenannte Dotplot, von Vorwärts- gegen Seitwärtsstreulicht. Diese Auftragung ermöglicht eine Diskriminierung von Debris und Zellen aufgrund der Größe und Oberflächenbeschaffenheit der Zellen. Nach diesem Ausschlussverfahren können mittels einer eindimensionalen Auftragung, dem sogenannten Histogramm, die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten aufgetragen und analysiert werden. Die als Listmode-Files gespeicherten Dateien wurden mittels der Software WinMDI 2.8 (J. Trotter, SCRIPPS-Institute, San Diego, USA) ausgewertet.

III.4.3 Direkte Markierung von Oberflächenantigenen

Zur direkten Markierung oder Einschnitt-Färbung von Zell-Oberflächenantigenen wurden die adhärenente Zellen mittels Dispase vom Boden der Kulturflasche abgelöst, in Medium resuspendiert und ca. 1×10^6 in Eppendorf-Gefäße pelletiert. Die Blockierung von unspezifischen Antikörperbindungsstellen erfolgte durch eine 30-minütige Inkubation der Zellen auf Eis in 500 µl Blockierlösung (PBS mit 2% FCS). Daraufhin wurden die Zellen erneut bei 2.000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 100 µl Antikörperlösung (Verdünnung 1:50 - 1:400) für mindestens 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nach drei sich anschließenden Waschschritten mit PBS erfolgte die Analyse der Zellsuspension (500 µl) am Durchflusszytometer. In einem Parallelansatz erfolgte stets eine entsprechende Inkubation mit einer subklassenspezifischen Isotypkontrolle als Negativkontrolle.

III.4.4 Indirekte Markierung von Oberflächenantigenen

Wenn kein direkt markierter Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen zur Verfügung steht, kann durch einen zweiten Färbeschritt, eine Inkubation mit einem sekundären, gegen den Primärantikörper gerichteten, konjugierten Antikörper, der Nachweis des Antigens erfolgen.

Ein Vorteil dieser Methode liegt in der höheren Sensitivität gegenüber einer direkt-konjugierten Antikörper-Markierung, bei der nur jeweils ein Fluorochrom zur Anwendung kommt. Bei dieser Methode können mehrere Sekundärantikörper an die Fc-Region des ersten Antikörpers binden.

Zur indirekten Markierung oder Zweischnitt-Färbung von Zelloberflächenantigenen wurden die adhärennten Zellen mittels Dispase vom Boden der Kulturflasche abgelöst, in Medium resuspendiert und ca. 1×10^6 in Eppendorf-Gefäße pelletiert. Die Blockierung von unspezifischen Antikörperbindungsstellen erfolgte durch eine 30-minütige Inkubation der Zellen auf Eis in 500 µl Blockierlösung (PBS mit 2% FCS). Daraufhin wurden die Zellen erneut bei 2.000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 100 µl Antikörperlösung (Verdünnung 1:50 - 1:400) für mindestens 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nach drei sich anschließenden PBS-Waschschritten erfolgte die Inkubation mit dem konjugierten Sekundärantikörper für 1 h auf Eis. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert, dreimal mit PBS gewaschen, in 500 µl PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer vermessen.

III.4.5 Doppelfärbung

Durch die Wahl von unterschiedlichen Chromophoren kann mit einer Mehrfachfärbung die Expression mehrerer Antigene durchflusszytometrisch analysiert werden. Verwendet man mehrere Fluoreszenzfarbstoffe, die sich in ihrem Emissionswellenlängenbereich überlagern, so muss die spektrale Überlappung ausgeglichen werden. Diese Verrechnung wird Kompensation genannt und wird für die folgenden Messungen dann konstant gehalten. Das in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer verfügt über ein elektronisches Kompensationssystem, mit dem dieser Abgleich durchgeführt wurde.

III.4.6 DNA-Färbung mit Propidiumiodid

Als DNA-Fluoreszenzfarbstoff wurde Propidiumiodid (PI) verwendet. Das Absorptionsmaximum von PI liegt bei 536 nm, das Emissionsmaximum bei 617 nm. In dieser Arbeit wurde die PI-Fluoreszenz immer im FL3-Kanal detektiert. Das polare Fluorochrom PI (Abbildung III.4) dringt durch die vorher mit 70%igem MeOH permeabilisierte Membran in die Zelle ein und interkaliert stöchiometrisch zwischen den Basen der doppelsträngigen Nukleinsäuren. Die resultierende Fluoreszenz ist proportional zum Gehalt an DNA und kann so zur DNA-Quantifizierung und zur Zellzyklus-Analyse verwendet werden.

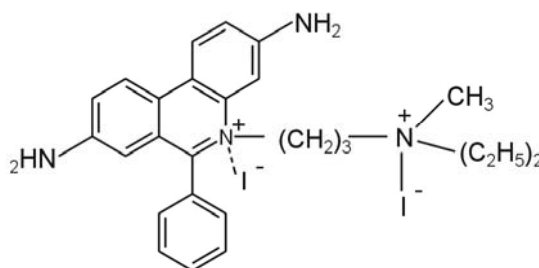


Abbildung III.4: Chemische Strukturformel von Propidiumiodid.

Für die PI-Färbung wurden die Zellen durch Trypsin von der Kulturflasche abgelöst und zu ca. 1×10^6 pelletiert. Durch die Zugabe von 1,0 ml 70%igem MeOH unter leichtem Vortexen erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembran bei gleichzeitiger Fixation der Zellen bei 4 °C für 30 min. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurde das Pellet in 425 µl PBS resuspendiert, mit 5 µl RNase (1mg/ml) versetzt und bei 37 °C 30 min inkubiert. Dieser Schritt zerstört doppelsträngige RNA, in die der DNA-Farbstoff ebenfalls interkalieren würde. Im Anschluss wurden die Zellen mit 25 µl des DNA-Farbstoffes PI (1mg/ml) für 5 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die Auswertung der Zellzyklus-Messung erfolgte mittels der Software Multicycle (Becton Dickinson, Heidelberg). In das DNA-Histogramm wurden drei Fitfunktionen eingepasst, stellvertretend für die G1-, S-, und G2/M-Populationen. Die Fläche unter den Kurven wurde integriert und die prozentualen Anteile der Phasen des Zellzyklus berechnet.

III.4.6.1 Zellzyklus-Analyse und Apoptose Nachweis

Proliferierende Zellen durchlaufen nacheinander folgende Stadien des Zellzyklus: G1 (*gap1*, Ruhephase), S (*synthesis*, DNA-Synthese) und G2/M (*gap2/ mitosis*, Mitose), erneut gefolgt von G1 [89]. Wenn man Zellen über diesen Zyklus hinweg verfolgt, besitzen diese in G1 den einfachen DNA-Gehalt, im Verlaufe von S wird dieser verdoppelt, in G2/M liegt der doppelte DNA-Gehalt vor und anschließend bei der Zellteilung halbiert sich dieser wiederum auf den einfachen Wert. Durch DNA-spezifische und DNA-stöchiometrische Fluoreszenzfarbstoffe lässt sich der DNA-Gehalt einer Zelle durchflusszytometrisch analysieren, und sich somit ihre Position im Zellzyklus feststellen (Abbildung III.5).

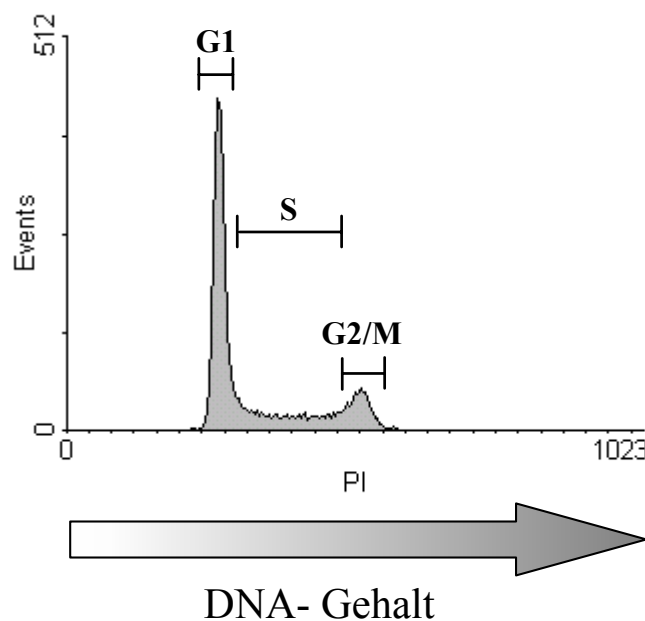


Abbildung III.5: Exemplarisches durchflusszytometrisch gemessenes DNA-Histogramm einer PI-Färbung.

Proliferierende Zellen in der exponentiellen Phase des Wachstums befinden sich zu einem hohen Anteil in der S- bzw. G2/M-Phase Phase des Zellzyklus. Anhand dieser Befunde lässt sich experimentell eine Proliferationsanalyse von PI-markierten Zellen durchführen.

Die Analyse von apoptotischen Zellen erfolgte am Durchflusszytometer durch Detektion fragmentierter genomischer DNA, die sich durch die Entstehung des sogenannten prä-G1-peaks zeigt. Abbildung III.6 verdeutlicht den Nachweis apoptotischer Zellen durch Quantifizierung des prozentualen Anteils der Zellen innerhalb des prä-G1-peaks, der bei diesem Beispiel bei 54% der Gesamtzellen liegt.

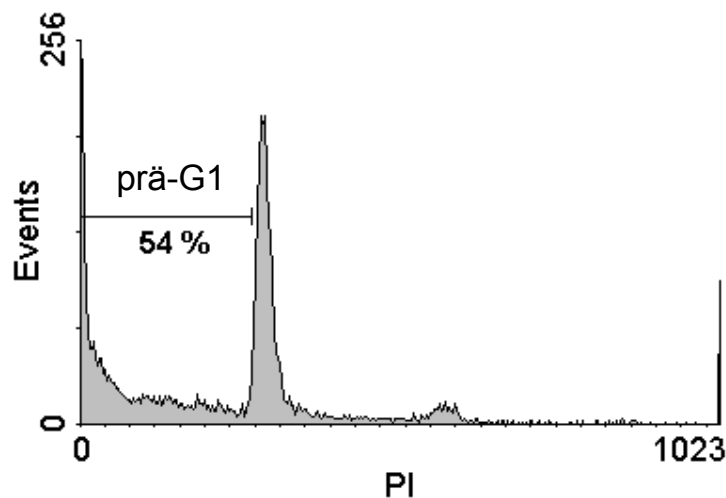


Abbildung III.6: Durchflusszytometrischer Nachweis von apoptotischen Zellen mittels PI-Markierung der Zellen und Quantifizierung des prä-G1-peaks.

III.4.6.2 Zell-Dublettendiskriminierung

Trotz sorgfältiger Zellvereinzelung treten bei der durchflusszytometrischen DNA-Analyse immer wieder Zelldubletten und größere Zell-Aggregate auf. Diese verfälschen durch ihre höhere Fluoreszenzintensität die Ergebnisse. Sie müssen erkannt und vor der Datenauswertung diskriminiert werden. Über Pulsprozessoren elektronisch verarbeitete DNA-Signale, integriert über die Zeit, ermöglichen eine Auflösung von Einzelzellen und Zell-Aggregaten. Da Dubletten die Dimension des Laserstrahls überschreiten und im Vergleich zu Einzelzellen länger brauchen, um diesen zu durchqueren, ergeben sie ein größeres DNA-Weitensignal als Einzelzellen mit der gleichen Fluoreszenzmarkierung.

Bei einer Zuweisung des DNA-Fluoreszenzsignals zu AUX (auxiliary parameter oder Impulshöhe) und einer zweidimensionalen Auftragung gegen die lineare PI-

Fluoreszenz können durch ein adäquates *Gating* Einzelzellen von Zell-Dubletten getrennt werden und diese Region zur Auswertung verwendet werden. In Abbildung III.7 ist eine Zell-Dublettendiskriminierung an mit PI gefärbten Zellen zu sehen. Im Dotplot wurden die Zellzyklusphasen G1, S, und G2/M beschriftet, welche sich in ihrem DNA-Gehalt unterscheiden und so ein unterschiedliches Impulshöhenignal (AUX) auf FL3 aufweisen. Die Lage der Zellen innerhalb der winkelhalbierenden Region verdeutlicht die Einzelzellen. Die unter dieser Region liegenden Dubletten konnten durch diese Art von Auftragung von der DNA-Auswertung diskriminiert werden.

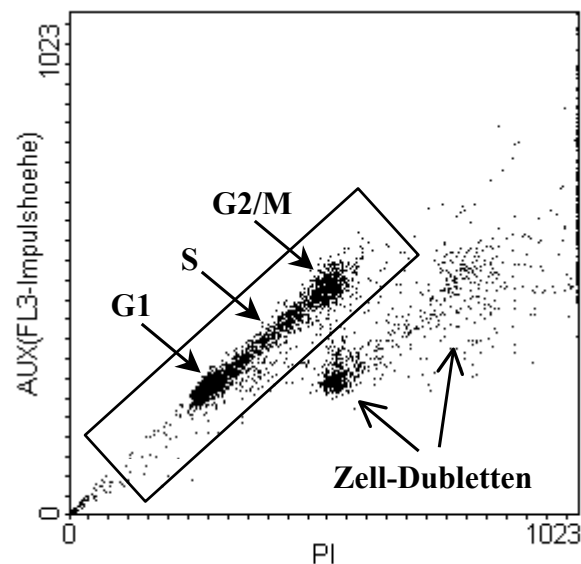


Abbildung III.7: Dotplot von PI-gefärbten HT-29-Zellen der linearen Fluoreszenzintensität gegen das AUX-Signal des FL3-Kanals mit Zell-Dublettendiskriminierung und Zellzyklusphasen.

IV ERGEBNISSE

Die freundliche Bereitstellung des neugenerierten, monoklonalen Antikörpers gegen den IL-11R α E24.2 [90], durch eine Kooperation mit dem Institut für Biochemie des Universitätsklinikums Aachen (Prof. P. C. Heinrich), ermöglichte uns erstmals die Analyse der Rezeptorexpression in der humanen Kolonmukosa auf Proteinebene. Das erste Ziel dieser Arbeit war daher, die *Targetzellen* einer IL-11-Aktion im humanen Kolon zu identifizieren. Ferner sollten durch die Lokalisation der Rezeptorexpression in der humanen Kolonmukosa weitere funktionelle Analysen zur IL-11R α Expression und Untersuchungen zu IL-11-induzierten immunmodulatorischen oder zytoprotektiven Effekten ermöglicht werden. Solche Effekte waren bisher zwar in verschiedenen Tiermodellen mit unterschiedlicher Schädigung der Kolonmukosa beschrieben worden, doch Daten aus der humanen Mukosa lagen bisher nicht vor.

IV.1 Untersuchungen zur IL-11R α Expression in der humanen Kolonmukosa

IV.1.1 Lokalisation der IL-11R α Expression

An Gefrierschnitten (5 μ m) aus Kolonresektaten von Patienten mit nichtentzündeter Mukosa wurde durch immunhistochemische Färbung die IL-11R α Expression in der humanen Kolonmukosa analysiert und lokalisiert. Für die immunhistochemischen Färbungen der IL-11R α -positiven Zellen wurden die Gefrierschnitte mit dem monoklonalen anti-IL-11R α Antikörper inkubiert. Zur Detektion der so markierten Zellen diente die entsprechend dem Protokoll durchgeführte DAB-Peroxidase Methode. Schnitte mit DAB-gefärbten, braunen Zellen wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Abbildung IV.1 zeigt in einem jeweils horizontalen (A) und einem vertikaler Schnitt (B) durch die Krypten der Kolonmukosa eine deutliche immunhistochemische Färbung des IL-11R α auf sämtliche Epithelzellen. Die gleichmäßige IL-11R α Färbung von der basolateralen Kryptenbasis

bis hin zum luminalen Kryptenende verdeutlicht eine kontinuierliche Verteilung des Rezeptors auf den Epithelzellen des Kolons entlang der Krypten.

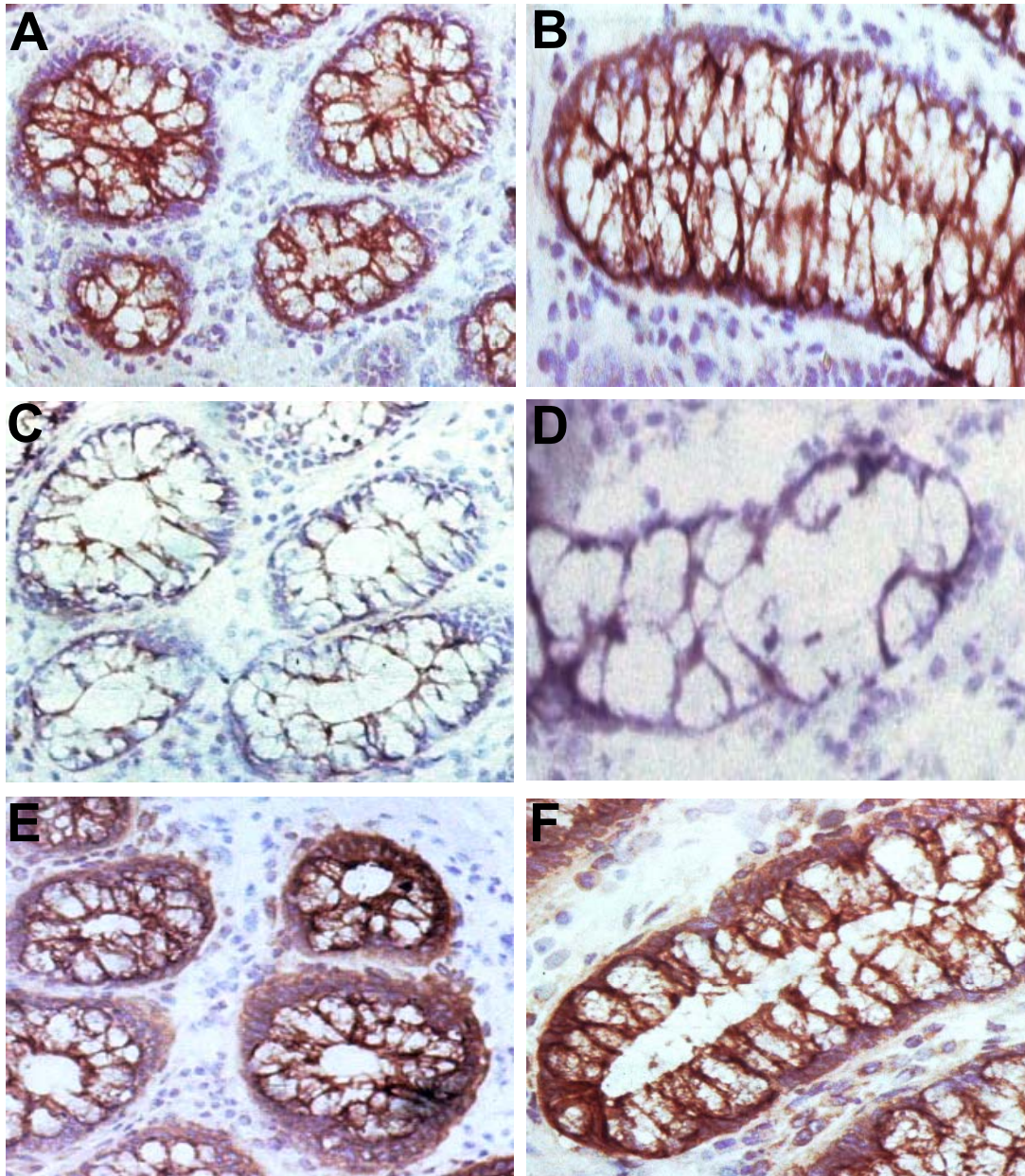


Abbildung IV.1: Immunhistochemische Charakterisierung der IL-11R α Expression in Gefrierschnittpräparaten aus nicht entzündeten Kolonresektaten. Inkubation mit monoklonalem anti-IL-11R α Antikörper E24.2 (A und B) mit anschließender Markierung mit der DAB-Peroxidase Methode. Negativkontrollfärbung mit einer IgG1 Isotypkontrolle (C und D). Epithelzellmarkierung mit dem monoklonalen Epithelzell-Antigenmarker EP-4 (E und F). Die IL-11R α Expression in der humanen Kolonmukosa beschränkt sich auf die Epithelzellen.

Die IgG1-Isotypen-Kontrollen waren jeweils negativ (Abbildung IV.1.C und D). Zur Bestätigung der Lokalisation der IL-11R α Expression auf den Epithelzellen wurden die Gefrierschnitte mit dem spezifischen Epithelzellantigenmarker EP-4 gefärbt. Die Epithelzellmarkierung (Abbildung IV.1.E und F) zeigt das identische Verteilungsmuster wie bei der Markierung mit dem anti-IL-11R α Antikörper.

IV.1.2 Immunhistochemischer Nachweis der IL-11R α Expression in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29

Die Ergebnisse aus den immunhistochemischen IL-11R α Färbungen an Schnitten aus Kolonresektaten richteten unser Interesse auf die Untersuchung der Expression in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29. HT-29-Zellen wurden dafür auf Glasobjektträgern kultiviert und anschließend für die immunhistochemischen Färbungen mit dem monoklonalen anti-IL-11R α Antikörper inkubiert. Die Detektion der positiven Zellen erfolgte wiederum mittels der DAB-Peroxidase Methode. Abbildung IV.2.A zeigt eine deutliche positive Färbung der HT-29-Zellen, im Vergleich zur IgG1 Isotypkontrollfärbung (Abbildung IV.2.B). Dieses Experiment demonstrierte eine signifikante IL-11R α -Expression auch auf HT-29-Zellen. Somit stand eine intestinale Epithelzelllinie mit positiver IL-11R α Expression zur Verfügung, um parallel zu den isolierten primären humanen Kolonepithelzellen (CEC) Untersuchungen durchführen zu können.

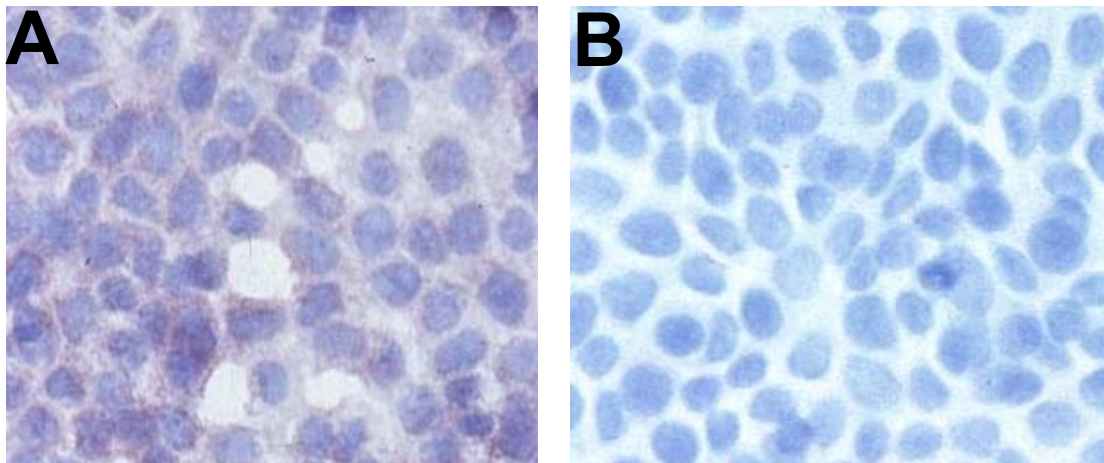


Abbildung IV.2: Immunhistochemische Analyse der IL-11R α Expression in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29. Die Zellen wurden auf Glasobjektträgern kultiviert und anschließend wie beschrieben gefärbt. Inkubation mit dem IL-11R α Antikörper E24.2 (A) und einer IgG1 Isotypkontrolle als Negativkontrolle (B). Die HT-29-Zellen sind IL-11R α positiv.

IV.1.3 Phänotypisierung der isolierten primären Zellen aus Kolonresektaten

IV.1.3.1 Durchflusszytometrische Analyse des Reinheitsgrades der Epithelzellfraktion

Da für die weiteren Untersuchungen zur funktionellen IL-11R α Expression vermehrt primäre Kolonepithelzellen benötigt wurden, stellte sich die Frage nach dem Reinheitsgrad der isolierten Primärzellen. Die in unserem Labor etablierte Methode zur Isolierung von humanen intestinalen Epithelzellen [36] garantiert einen hohen Reinheitsgrad der Epithelzellfraktion. Da allerdings bei nachfolgenden Amplifikationsmethoden von aus CEC isolierten Nukleinsäuren geringe Kontaminationen mit nicht-epithelialen Zellen aus der Lamina propria erhebliche Beeinträchtigungen darstellen würden, wurde die isolierte Epithelzellfraktion mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf ihren Reinheitsgrad untersucht. Hierfür wurden die frisch isolierten Enterozyten mittels einer Dispase-Behandlung einzelt und anschließend für die Epithelzellcharakterisierung mit dem FITC-gekoppelten Antikörper gegen das Epithelzellantigen EP-4 markiert. Die durch-

flusszytometrische Analyse ergab 98% EP-4/FITC positive Zellen (Abbildung IV.3), im Vergleich zu der Markierung mit einer IgG1-FITC Isotypkontrolle. Die in dieser Arbeit verwendete Isolationsmethode garantiert demnach einen Reinheitsgrad von mindestens 98% für die aus Kolonresektaten isolierten Epithelzellen. Dieser Reinheitsgrad ist für molekularbiologische Untersuchungen ausreichend. Es ist zudem anzunehmen, dass es sich bei den 2% Verunreinigung partiell um ein Phänomen der Messungengenauigkeit des Durchflusszytometers handelt. Selbst bei relativ homogenen Zellpopulationen, wie Zelllinien, kann mit dieser Nachweismethode praktisch nie eine Antigenexpression in 100% der Zellen nachgewiesen werden.

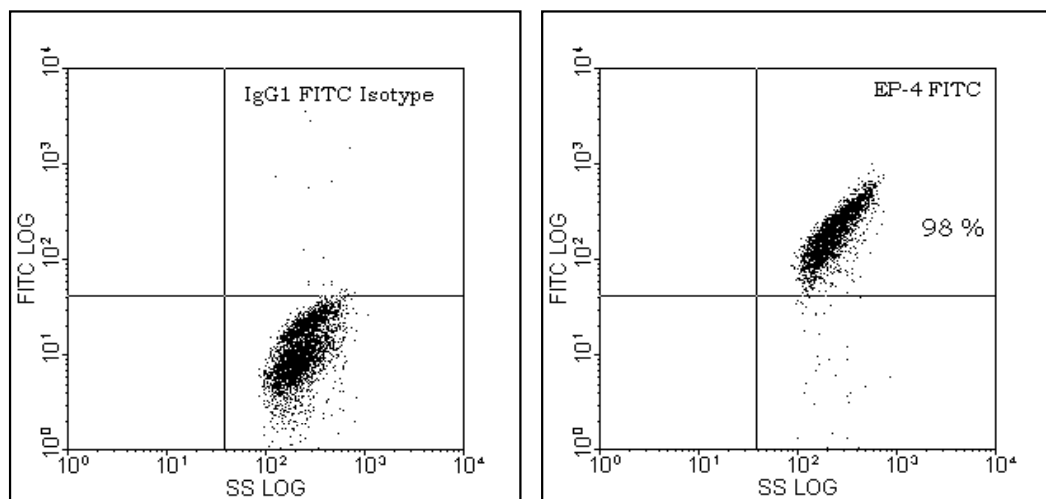


Abbildung IV.3: Durchflusszytometrische Analyse zum Reinheitsgrad der frisch isolierten CEC. Nach Isolierung aus Kolonresektaten und Zellvereinzelung mit Dispase wurden die Zellen mit dem monoklonalen, FITC-konjugierten Antikörper EP-4 als Epithelzellmarker inkubiert (rechts). Angabe der prozentualen EP-4/FITC positiven Zellen im Vergleich zu der Negativkontrolle, einer FITC-konjugierten IgG1 Isotypkontrolle (links). 98% EP-4 positive Zellen in der Epithelzellfraktion weisen auf einen hohen Reinheitsgrad hin.

IV.1.3.2 Durchflusszytometrische Analyse auf kontaminierende Zellen in der Epithelzellfraktion

Zur weiteren Analyse einer möglichen, geringfügigen (< 2%) Kontamination der Epithelzellfraktion mit Zellen nicht epithelialen Ursprungs, wurden diese auf weitere Lamina propria-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Als Marker für die in Frage kommenden Zellen wurden zelltypspezifische, Fluorochrom-konjugierte Antikörper verwendet. Es konnten keine positiven Signale unter Verwendung von anti-CD117 (Mastzellen), anti-CD68 (Makrophagen), anti-CD3 (T-Zellen) oder anti-Fibroblastenmarker (Fibroblasten) Antikörpern in der Epithelzellfraktion detektiert werden (Abbildung IV.4). Als Negativkontrollen dienten entsprechende subklassenspezifische Isotypkontrollen.

Durchflusszytometrisch konnte somit keine Kontamination der isolierten CEC mit Lamina propria-Zellen detektiert werden. Diese Untersuchungen bestätigen den hohen Reinheitsgrad der Epithelzellisolation und die Annahme, dass es sich bei den verbleibenden 2% „Verunreinigung“ aus den Versuchen mit der EP-4 Markierung (siehe Abbildung IV.3) um ein Sensitivitätsproblem der Messmethode und um keine reale Kontamination handelt.

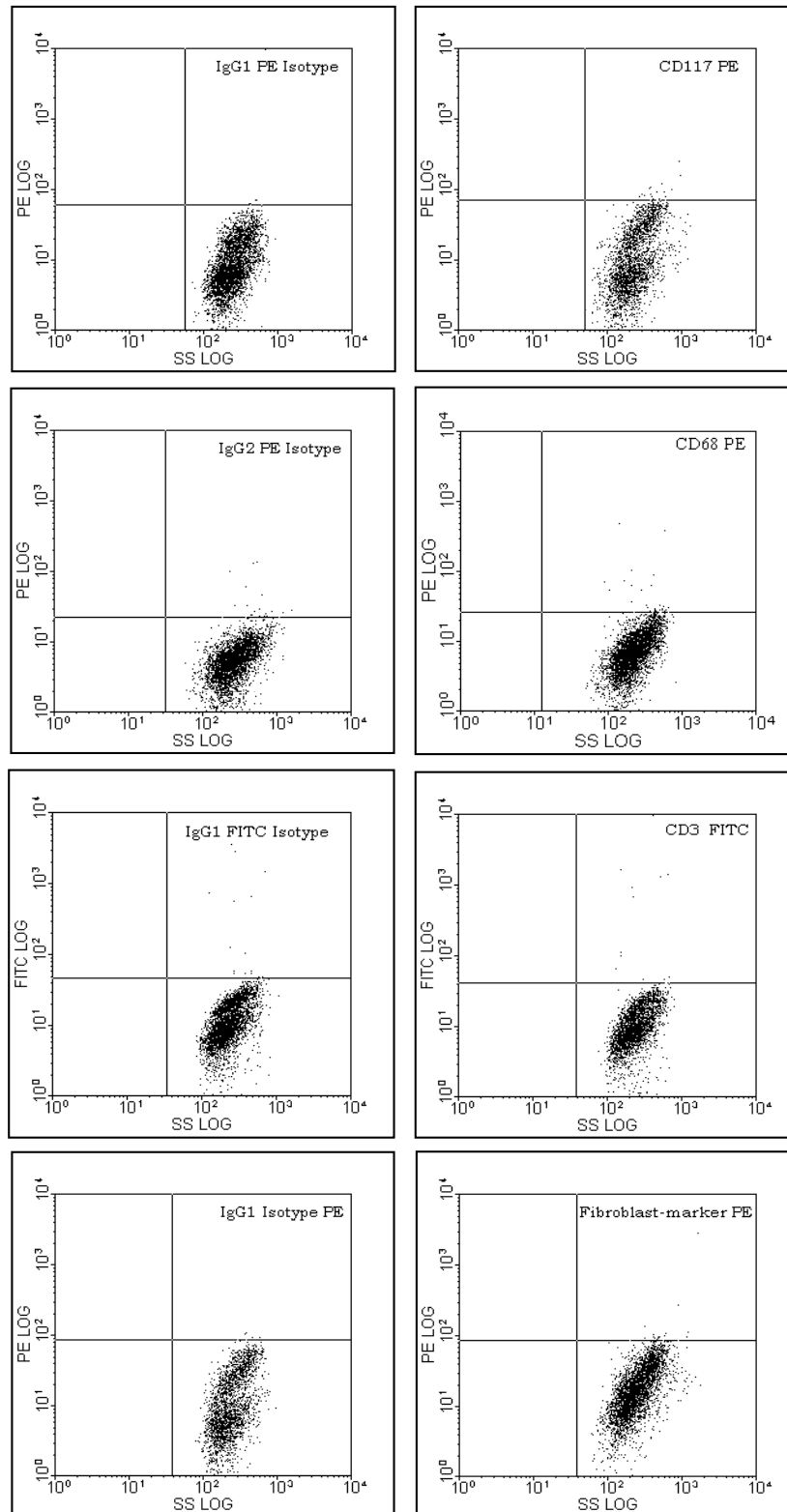


Abbildung IV.4: Durchflusszytometrische Analyse auf mögliche kontaminierende Zellen in der isolierten Epithelzellfraktion. Zum Nachweis einer möglichen Kontamination mit Lamina propria-Zellen wurden die frisch isolierten Zellen mit Antikörper gegen Mastzellen (CD117 PE), Makrophagen (CD68 PE), T-Zellen (CD3 FITC) und Fibroblasten (Fibroblastenmarker PE) inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert (rechts). Als Negativkontrollen dienten entsprechende subklassenspezifische Isotypkontrollen (links). Die Analyse zeigte keine detektierbare Kontamination der isolierten Epithelzellfraktion mit Lamina propria-Zellen..

IV.1.3.3 Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoserate primärer humaner Kolonepithelzellen nach der Epithelzellisolation

Die Isolation und speziell die Langzeitkultur von CEC ist schwierig und gelang bislang nur wenigen Arbeitsgruppen [36,91]. Der Grund dafür liegt im wesentlichen darin, dass diese Zellen hochgradig verankerungsabhängig sind. Werden die Epithelzellen nach Isolation nicht sehr schnell verarbeitet bzw. auf einer Biomatrix kultiviert, kommt es durch Verlust der Zell-Zell sowie Zell-Matrix-Verankerung innerhalb von wenigen Stunden zur massiven Induktion des programmierten Zelltodes, der Apoptose [92,93].

Diese durch Verlust der Zellverankerung getriggerte Form der Apoptose wird als „Anoikis“ bezeichnet und ist für diverse adhärent wachsende Zellen beschrieben [23]. Nach Bestimmung des Reinheitsgrades der Epithelzellfraktion wurden die Zellen auf eine mögliche Apoptoseinduktion durch den Isolierungsvorgang untersucht. Dafür wurden die CEC unmittelbar nach der Isolation mit MeOH (70%) permeabilisiert und mit dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI) inkubiert. Die Analyse der apoptotischen Zellen erfolgte am Durchflusszytometer durch Detektion von fragmentierter genomischer DNA, die sich durch die Entstehung des sogenannten prä-G₁-peaks nachweisen lässt. Bei der hier exemplarisch gezeigten Analyse auf apoptotische Zellen nach der Epithelzellisolation ließen sich 7,3% der PI-gefärbten Zellen in der prä-G₁-Region detektieren (Abbildung IV.5). Weitere Analysen ergaben ähnlich niedrige Prozentsätze an apoptotischen Zellen nach der Epithelzellisolation. Die erhaltenen Prozentsätze sind aufgrund der hohen Sensitivität primärer humaner Kolonepithelzellen gegenüber Veränderungen des Zell-Zell oder Zell-Matrixkontaktes als gering einzustufen.

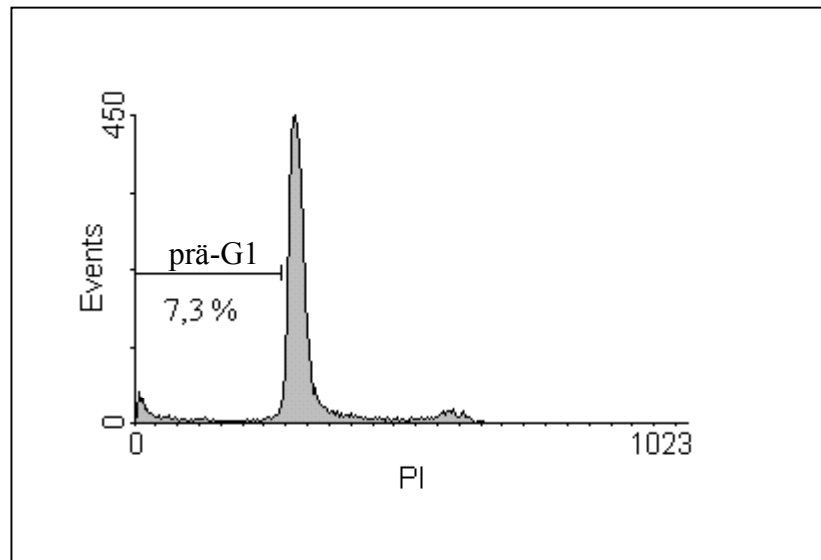


Abbildung IV.5: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptose von frisch isolierten CEC. Isolierte Epithelzellen wurden mittels Dispase vereinzelt, die Induktion der Apoptose durchflusszytometrisch nach PI-Färbung der DNA und über die Entstehung des prä-G1-peaks nachgewiesen. Angabe als prozentualer Anteil der apoptotischen Zellen. Frisch isolierte CEC zeigen nur einen geringen Anteil an apoptotischen Zellen nach der in dieser Arbeit verwendeten Isolationsmethode.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden Zelllysate aus frisch isolierten CEC auf aktivierte Caspase-3, eine relativ früh in der Apoptosekaskade aktivierte Proteinase, mittels Western Blotting analysiert. Diese Versuche zeigten keine Aktivierung der Caspase-3 in frisch isolierten CEC und validierten die durchflusszytometrischen Ergebnisse der Durchflusszytometrie.

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Isolierung von CEC weist nur eine geringe Apoptoseinduktion auf.

IV.1.4 Untersuchung der IL-11R α Transkription in Kolon-epithelzellen

Die Ergebnisse aus den immunhistochemischen Untersuchungen, die eine exklusive Expression des IL-11R α auf den Epithelzellen der Kolonmukosa sowie in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 gezeigt hatten, veranlassten uns die IL-11R α mRNA Expression in den genannten Zellen zu untersuchen.

IV.1.4.1 Expression von IL-11R α mRNA in der RT-PCR

Die IL-11R α mRNA Expression wurde zunächst im Folgenden mittels semi-quantitativer RT-PCR untersucht. Dazu wurden geeignete mRNA-spezifische Oligonukleotid-Primer gewählt, die in verschiedenen Exons hybridisieren. Durch eine zusätzliche Amplifikation von Intronsequenzen lässt sich mit den gewählten Primern eine mögliche Verunreinigung der isolierten Gesamt-RNA mit genomischer DNA nachweisen. Aus HT-29-Zellen und CEC isolierte Gesamt-RNA wurde revers transkribiert. Die RT-PCR ergab ein mit den erwarteten Größen von 339 bp cDNA-Amplifikat für den IL-11R α in HT-29 und CEC (Abbildung IV.6). Die RT-PCR für das *Housekeeping-Gen* G3PDH zeigte ein 529 bp großes Produkt bei der spezifischen Amplifikation und diente als interne Kontrolle der Reaktion.

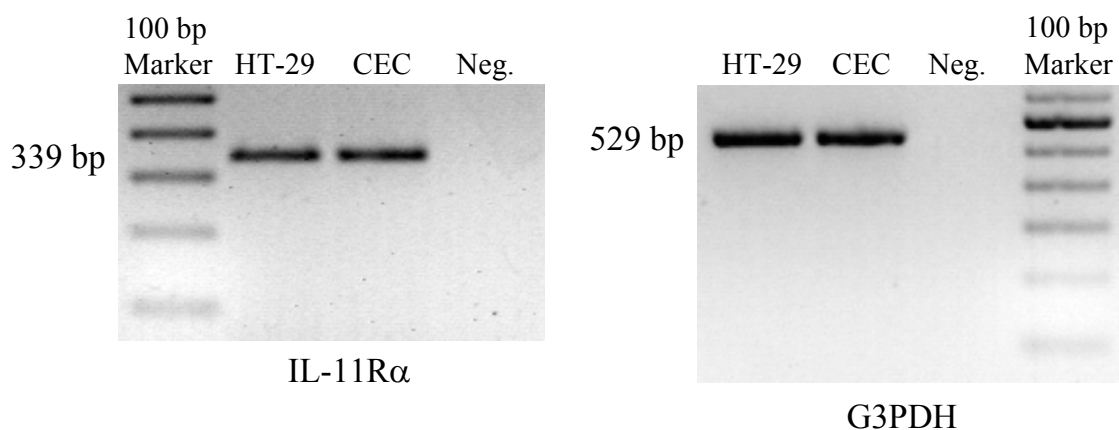


Abbildung IV.6: IL-11R α mRNA Expression in Kolonepithelzellen. RT-PCR mit isolierter Gesamt-RNA aus HT-29-Zellen und CEC mit spezifischen Primern für IL-11R α (links). RT-PCR ergibt ein spezifisches cDNA-Amplifikat von 339 bp. Die Integrität der untersuchten mRNA wurde anhand einer spezifischen Amplifikation des Housekeeping-Gens G3PDH überprüft (rechts). Marker = Standard 100 bp-Leiter. Die untersuchten Kolonepithelzellen exprimieren konstitutiv IL-11R α mRNA.

Die Spezifität der IL-11R α RT-PCR wurde durch einen Verdau der erhaltenen cDNA Amplifikate mit dem Restriktionsendonuklease *Pae* III gezeigt. Der enzymatische Verdau des 339 bp großen Produkt aus der IL-11R α RT-PCR zu zwei spezifischen Fragmenten der Größe von 223 und 116 bp beweist das Vorhandensein der erwarteten Schnittstelle für das Restriktionsenzym und damit die Spezifität der Amplifikation (Abbildung IV.7).

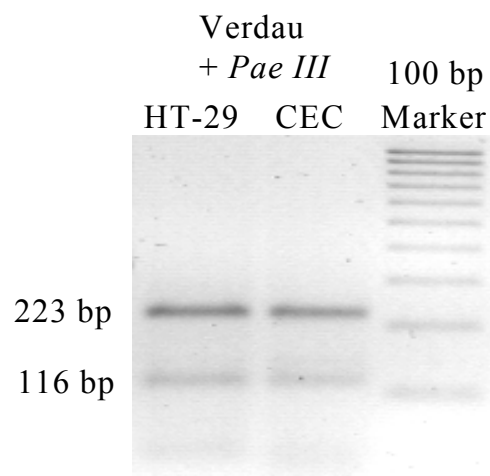


Abbildung IV.7: Spezifitätsnachweis der IL-11R α RT-PCR. Die erhaltenen cDNA Amplifikate aus der IL-11R α RT-PCR wurden mit der Restriktionsendonuklease *Pae* III behandelt. Der enzymatische Verdau des 339 bp großen Produkts der IL-11R α RT-PCR zu zwei spezifisch Fragmenten der Größe von 223 und 116 bp beweist die Spezifität der Amplifikation.

IV.1.4.2 Expression von IL-11R α mRNA im Northern Blot

Zur Validierung der Ergebnisse aus der IL-11R α spezifischen RT-PCR verwendeten wir den Northern Blot. Hierbei wurde aus HT-29 und CEC isolierte Gesamt-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran geblottet. An Hand der bekannten Sequenz für die IL-11R α mRNA wurden Oligonukleotid-Primer für die Northern Blot-Sonde ausgewählt und mittels PCR ein Fragment gewonnen, welches nach radioaktiver Markierung als Sonde diente. Wir konnten die konstitutive IL-11R α mRNA Expression in HT-29 und CEC mit dieser Methode bestätigen und detektierten ein Transkript von 1,8 kb Länge spezifisch für die IL-11R α mRNA (Abbildung IV.8). Als Kontrolle der

eingesetzten RNA-Menge diene eine Hybridisierung mit einer G3PDH-spezifischen Sonde.

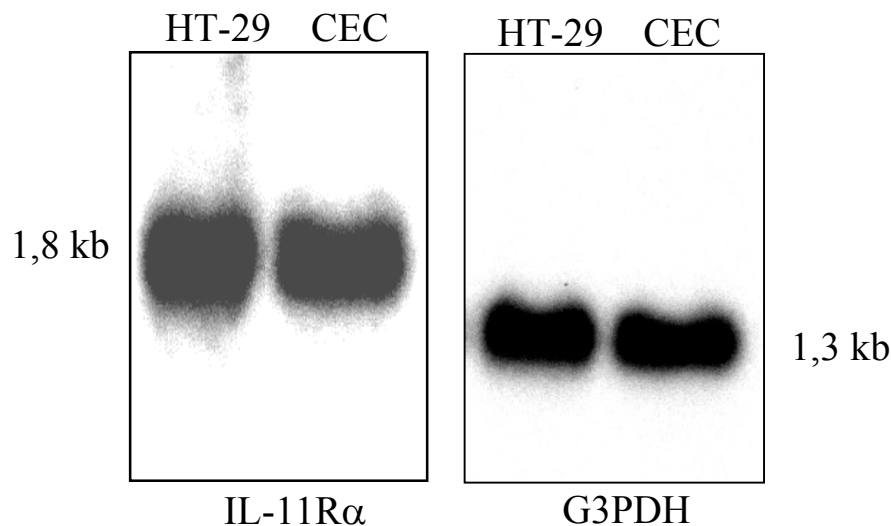


Abbildung IV.8: Expression von IL-11R α mRNA in Kolonepithelzellen. Northern Blot mit Gesamt-RNA aus HT-29-Zellen und CEC. Hybridisierung mit einer [32 P] markierten Sonde spezifisch für IL-11R α (links) und G3PDH als interne Kontrolle (rechts). Northern Blot verdeutlicht eine konstitutive IL-11R α mRNA Expression in Kolonepithelzellen.

IV.1.5 Analyse der IL-11R α Expression in Kolonepithelzellen

Nach der Untersuchung der IL-11R α Transkription in Kolonepithelzellen folgte die Analyse der Rezeptorexpression auf Proteinebene. Dabei wurden zuerst zytosolische Fraktionen der Zellen mittels Western Blotting auf IL-11R α Protein untersucht und anschließend durchflusszytometrisch die Zelloberflächenexpression ermittelt.

IV.1.5.1 Expression von IL-11R α Protein im Western Blot

Zum Nachweis der IL-11R α Translation in Kolonepithelzellen wurden zytosolische Gesamtproteinlysate von CEC und HT-29-Zellen gewonnen und mittels einer SDS Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion mit dem monoklonalen anti-IL-11R α Antikör-

per E24.2. Es konnten jeweils drei immunreaktive Banden mit diesem Antikörper in den untersuchten Kolonepithelzellen nachgewiesen werden (Abbildung IV.9). Die Bande von 49 kDa entspricht die der in der Literatur angegebenen Größe für den IL-11R α . Bei den zwei weiteren immunreaktiven Banden von 33 und 36 kDa könnte es sich um bereits beschriebene Isoformen des Rezeptors handeln, denen ein Teil der zytoplasmatischen Domäne fehlt [68] und einen verschieden hohen Anteil an N-Glykosylierung besitzen. Immunpräzipitationsversuche mit anschließender Detektion mit einem anderen, polyklonalen anti-IL-11R α Antikörper zeigten ein identisches Bandenmuster bei den untersuchten zytosolischen Gesamtproteinlysaten.

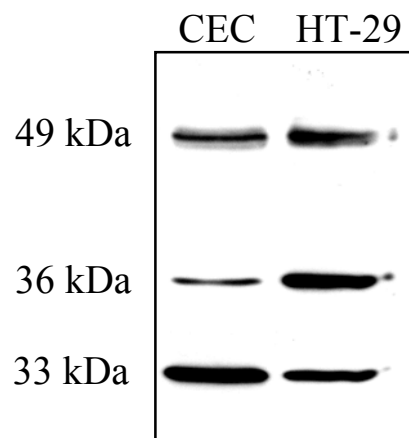


Abbildung IV.9: IL-11R α Proteinexpression in Kolonepithelzellen. Western Blot mit monoklonalem anti-IL-11R α Antikörper an zytosolischem Gesamtprotein aus CEC und HT-29-Zellen. Beladung eines 10%igen SDS-Polyacrylamidgels mit 50 μ g Protein pro Spur. Drei immunreaktive Banden wurden detektiert, von der die 49 kDa Bande der vollständigen α -Kette des IL-11 Rezeptors entspricht. Konstitutive IL-11R α Translation in Kolonepithelzellen.

IV.1.5.2 Zelloberflächenexpression von IL-11R α Protein in der Durchflusszytometrie

IV.1.5.2.1 Titration des monoklonalen anti-IL-11R α Antikörpers für die durchflusszytometrische Analyse

Da der in dieser Arbeit verwendete, neu generierte Antikörper gegen den IL-11R α kommerziell noch nicht erhältlich war, lagen auch keine Daten bezüglich der Verwendung für die durchflusszytometrische Analyse vor. Somit musste ein Inkubationsprotokoll etabliert werden, indem der monoklonale Antikörper E24.2 an einer Positivkontrollzelllinie austitriert wurde. HT-29-Zellen wurden hierfür mit einer log₂-Verdünnung (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600) des anti-IL-11R α Antikörpers inkubiert, anschließend mit einem PE-gekoppelten Sekundärantikörper (1:50 Verdünnung) markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung IV.10 zeigt die eindimensionale Darstellung (Histogramm) der logarithmischen FL2-Kanal-Fluoreszenz (PE) der verschiedenen Inkubationsansätze.

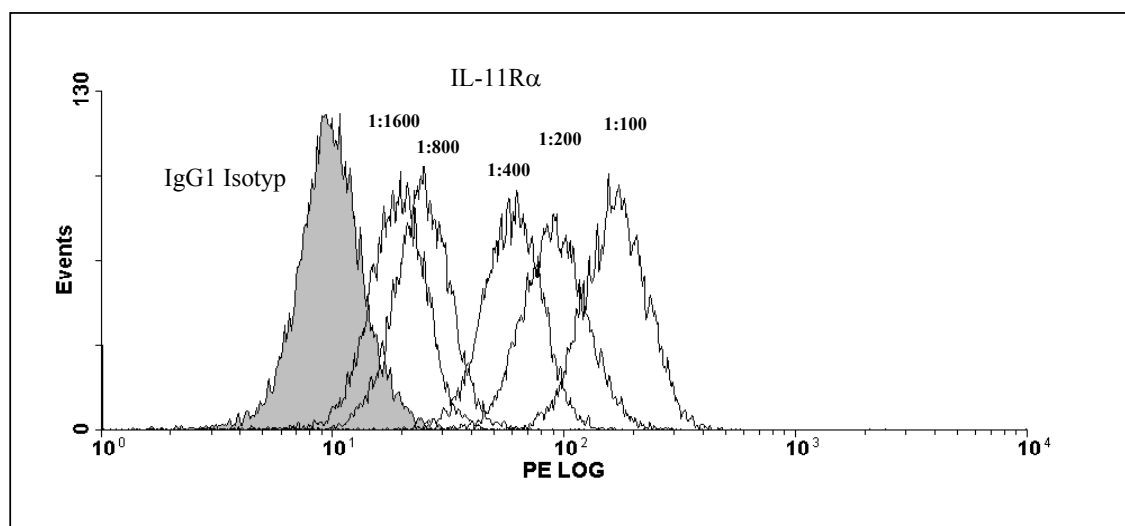


Abbildung IV.10: Titration des monoklonalen anti-IL-11R α Antikörpers E24.2 an HT-29-Zellen für die durchflusszytometrische Analyse. Verdünnungsreihe des primären anti-IL-11R α Antikörpers mit anschließender Inkubation mit einem PE-konjugierten Sekundärantikörper (1:50 Verdünnung). IgG1 Isotypkontrolle als Negativkontrolle (grau). Stufenweise Fluoreszenzabnahme mit steigender Verdünnung verdeutlicht eine spezifische Antikörper-Epitop-Reaktion und Anwendungsmöglichkeit des monoklonalen anti-IL-11R α Antikörpers in der Durchflusszytometrie.

Die Abnahme der Fluoreszenzintensität mit der Verdünnung des Primärantikörpers demonstrierte eine spezifische Reaktion mit dem IL-11R α auf der Zelloberfläche der HT-29-Zellen. Der monoklonale anti-IL-11R α Antikörper kann somit zum durchflusszytometrischen Nachweis benutzt werden. Am optimalsten erschien eine Verdünnung von 1: 400, um einerseits einen signifikanten Unterschied zwischen Isotyp- und Antikörperfärbung detektieren zu können und andererseits sparsam den limitiert zur Verfügung stehenden Antikörper für zahlreiche durchflusszytometrische Ansätze verwenden zu können.

IV.1.5.2.2 IL-11R α Zelloberflächenexpression in der Durchflusszytometrie

Mit den unter IV.5.2.1 etablierten anti-IL-11R α Antikörper Markierung konnte nun die Zelloberflächenexpression des Rezeptors auf Kolonepithelzellen durchflusszytometrisch untersucht und quantifiziert werden. In Abbildung IV.11 ist die Analyse von HT-29-Zellen, mit 91% anti-IL-11R α positiven Zellen dargestellt. Die Färbung von HT-29 mit einer IgG1-Isotypkontrolle diente als Negativkontrolle.

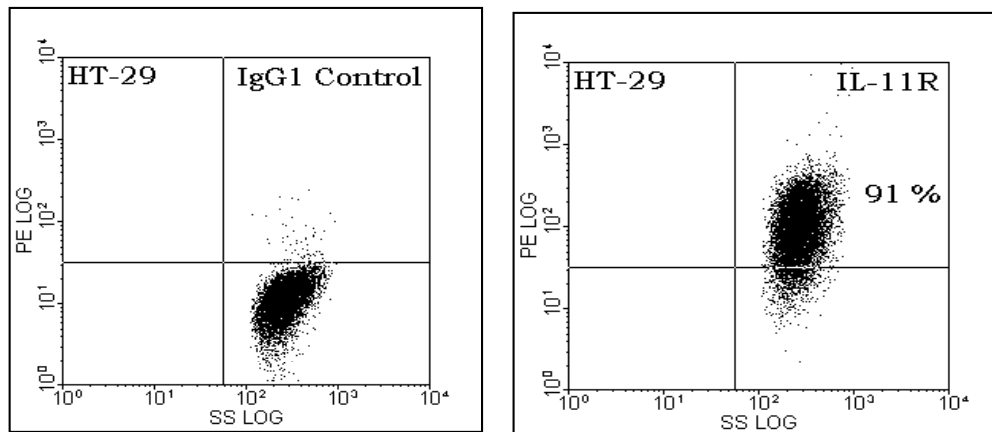


Abbildung IV.11: Durchflusszytometrische Analyse der IL-11R α Expression auf HT-29-Zellen. Markierung der Zellen mit monoklonalem anti-IL-11R α Antikörper (rechts), einer IgG1 Isotypkontrolle als Negativkontrolle (links) und anschließender Inkubation mit PE-gekoppelten Sekundärantikörper. 91% der HT-29-Zellen sind positiv für den IL-11R α .

Für den Nachweis der IL-11R α Expression auf CEC wurde zuerst eine Epithelzellmarkierung mittels EP-4/FITC Inkubation vorgenommen. 97% der untersuchten Zellen war dabei EP-4 positiv (Abbildung IV.12, oben). Bei der Analyse für die IL-11R α Expression waren 93% der isolierten Zellen im Vergleich zu der entsprechenden IgG1 Isotypkontrolle positiv (Abbildung IV.12, mitte). 87% der analysierten Primärzellen waren doppelt positiv bei der Zweiparameter Analyse im FL1/FITC-(EP-4) und FL2/PE-(IL-11R α) Kanal. Diese Ergebnisse zeigten deutlich eine Zelloberflächenexpression auf HT-29-Zellen und CEC.

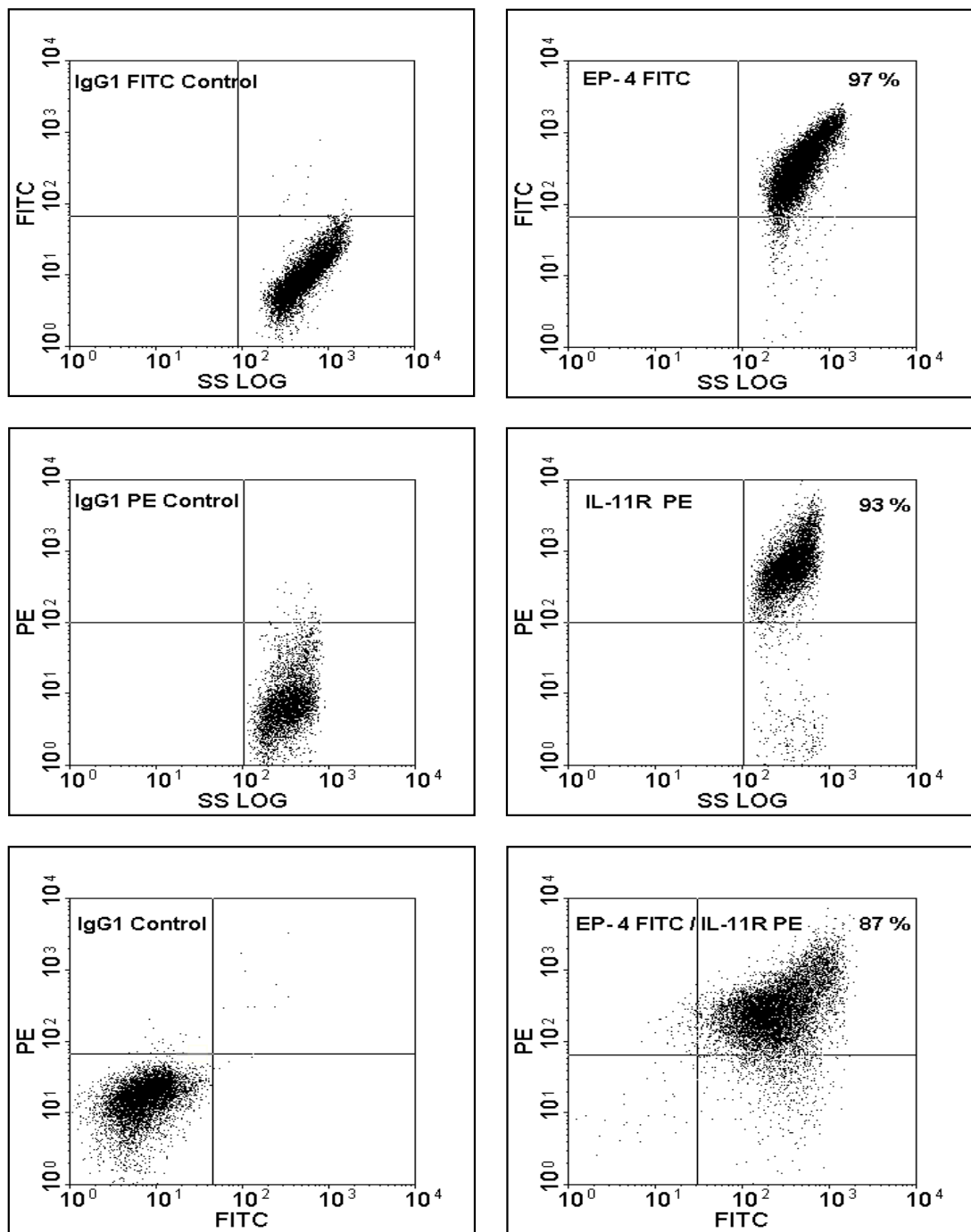


Abbildung IV.12: Durchflusszytometrische Analyse der IL-11R α Expression auf frisch isolierte CEC. Epithelzellmarkierung mit einem anti-EP-4 FITC Antikörper (oben) und PE-Markierung des IL-11R α (mitte). Zweiparameteranalyse mittels EP-4/FITC und IL-11R α /PE Markierung (unten). Entsprechende Isotypkontrollfärbungen als Negativkontrollen (links). CEC exprimieren den IL-11R α auf ihrer Oberfläche (87% positive Zellen).

IV.1.6 Analyse der gp130 Ko-Expression in Kolonepithelzellen

Der funktionelle IL-11R α Rezeptorkomplex für eine Ligand-spezifische Signaltransduktion wurde kürzlich als Hexamerkomplex, bestehend aus jeweils zwei Molekülen IL-11, IL-11R α und gp130 beschrieben [77]. Das nächste Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung der Ko-Expression der IL-11 signaltransduzierenden Untereinheit gp130 auf Kolonepithelzellen.

IV.1.6.1 gp130 Ko-Expression im Western Blot

Zum Nachweis der gp130 Translation in Kolonepithelzellen wurden zytosolische Gesamtproteinlysate von CEC und HT-29-Zellen isoliert und mittels einer SDS Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion mit einem polyklonalen anti-gp 130 Antikörper. Wie der Western Blot an Zelllysaten aus frisch isolierten CEC und HT-29-Zellen zeigte, exprimieren Kolonepithelzellen gp130 Protein konstitutiv (Abbildung IV.13) Die Beladungskontrolle mit β -Aktin verdeutlichte eine höhere Translationsrate in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 als in frisch isolierten CEC.

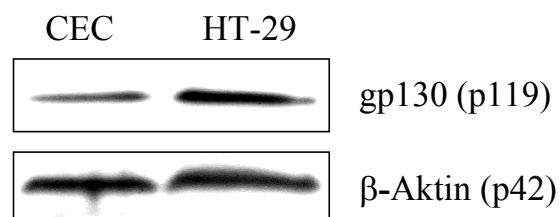


Abbildung IV.13: gp130 Ko-Expression in Kolonepithelzellen. Western Blot an zytosolischem Gesamtprotein aus CEC und HT-29-Zellen mit polyklonalem anti-gp130 Antikörper (oben). Beladung eines 6%igen SDS-Polyacrylamidgels mit 50 μ g Protein pro Spur. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis des Housekeeping-Proteins β -Aktin (unten). Kolonepithelzellen zeigen eine konstitutive gp130 Translation.

IV.1.6.2 gp130 Zelloberflächenexpression in der Durchflusszytometrie

Nach der unter IV.6.2.1 gezeigten Untersuchung der Expression von gp130 Protein in Kolonepithelzellen mittels Western Blot folgte die durchflusszytometrische Analyse der Zelloberflächenexpression. 94% der HT-29-Zellen und 80% der frisch isolierten CEC waren in der durchflusszytometrischen Messung positiv für gp130 (Abbildung IV.14). Eine Inkubation der Zellen mit dem sekundären, anti-Kaninchen FITC konjugierten Antikörper diente als Negativkontrolle. Diese Untersuchungen validierten die Ergebnisse des Western Blots, die bereits eine höhere gp130 Proteinexpression in HT-29-Zellen demonstrierten.

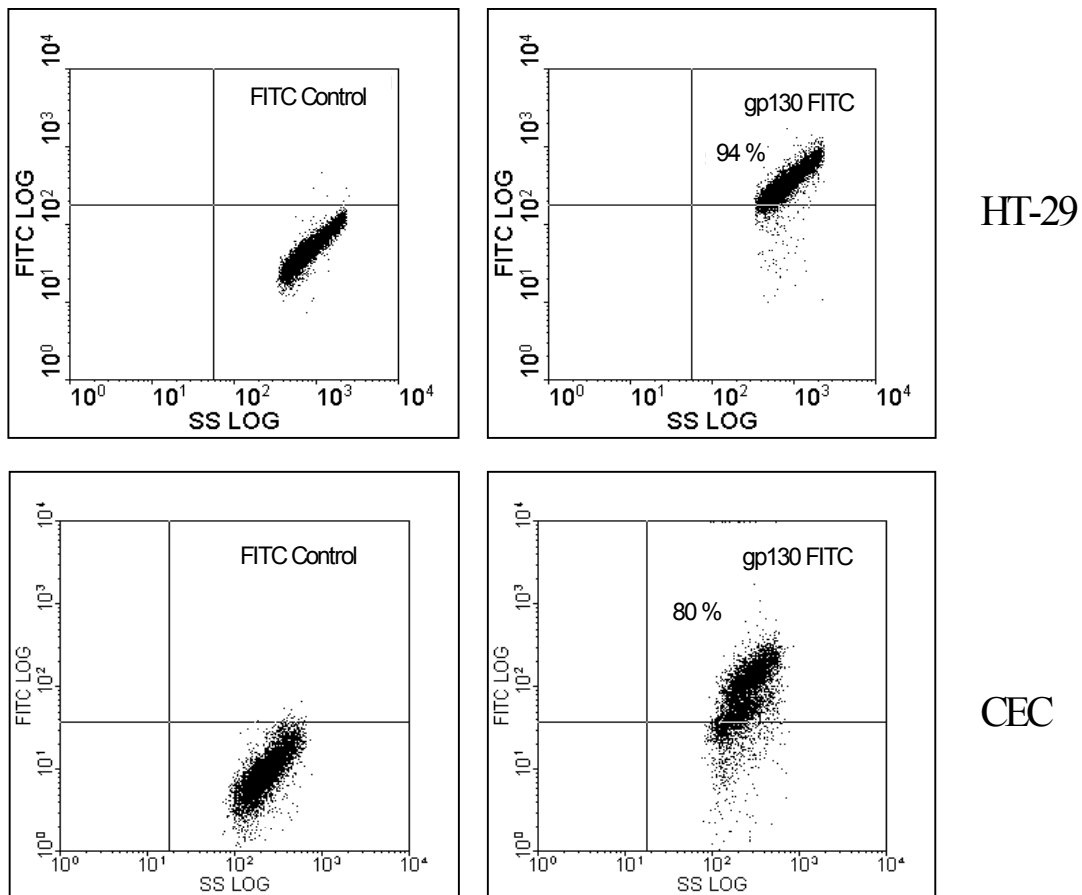


Abbildung IV.14: Durchflusszytometrische Analyse der gp130 Expression auf Kolonepithelzellen. Indirekte gp130/FITC Markierung von HT-29-Zellen und CEC (rechts). IgG1 Isotypkontrollen als Negativkontrollen (links). Die untersuchten Kolonepithelzellen exprimieren die IL-11-signaltransduzierende Untereinheit gp130 auf ihrer Zelloberfläche.

IV.2 Untersuchungen zur IL-11-induzierten Signaltransduktion in Kolonepithelzellen

Mit den vorausgegangenen Untersuchungen zur Expression des IL-11R α und der signaltransduzierenden Untereinheit gp130 in CEC und der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 waren die notwendigen Voraussetzungen für einen möglichen Einfluss auf diese Zellen gezeigt worden. Als nächstes war die Frage zu klären, ob eine IL-11 induzierte Signaltransduktion in Kolonepithelzellen stattfindet, um damit den Nachweis der Funktionalität der in IV.1 gezeigten Expression der α -kette des Rezeptors zu liefern.

Ein bedeutender Signaltransduktionsweg für den IL-11R α und andere Rezeptoren aus IL-6 Rezeptor Familie ist der Jak/STAT Signalweg [79]. Zum Nachweis der Funktionalität des IL-11R α auf Kolonepithelzellen wurde die Aktivierung dieses Signalweges in Abhängigkeit einer IL-11 Stimulation untersucht.

IV.2.1 Jak1 Phosphorylierung im Western Blot

Zuerst erfolgte der Nachweis der Aktivierung von Jak1 über den Nachweis der Phosphorylierung nach einer Stimulation mit rek. humanen IL-11. Für diese Versuche wurden die HT-29-Zellen nach Erreichen eines konfluenten Wachstumszustandes für 24 Stunden mit „Hungermedium“ (ohne FCS) inkubiert, um die basale zytosolische Phosphorylierung in den Zellen auf ein Minimum zu reduzieren. HT-29-Zellen wurden anschließend mit ansteigenden IL-11 Konzentrationen für 15 min inkubiert, lysiert und mittels Western Blotting die Phosphorylierung von Jak1 detektiert. Für diese Versuche kam ein polyklonaler Antikörper zum Einsatz, der spezifisch die an den Tyrosinresten 1022 und 1023 phosphorylierte Form von Jak1 erkennt. In Abbildung IV. 15 (oben) ist der Western Blot der IL-11-induzierten Aktivierung von Jak1 (P-Jak1) in HT-29-Zellen gezeigt. Eine Inkubation der Zellen mit ansteigenden IL-11 Konzentrationen induzierte eine dosisabhängige Jak1 Phosphorylierung, mit einem Maximum bei 100 ng/ml IL-11. Die Jak1 Proteinexpression blieb bei der Stimulation mit unterschiedlichen Mengen an IL-11 unbeeinflusst.

Die Zeitkinetik der Aktivierung der Tyrosinkinase in HT-29-Zellen mit 100 ng/ml IL-11 zeigte eine rasche, bereits nach einer Minute nachweisbare, Jak1 Phosphorylierung. Nach 15 min erreichte die Phosphorylierung von Jak1 ein Maximum und reduzierte sich während der folgenden nächsten 45 min wieder (Abbildung IV. 15, unten). Auch bei dieser Zeitkinetik blieb die Jak1 Gesamtproteinmenge unverändert.

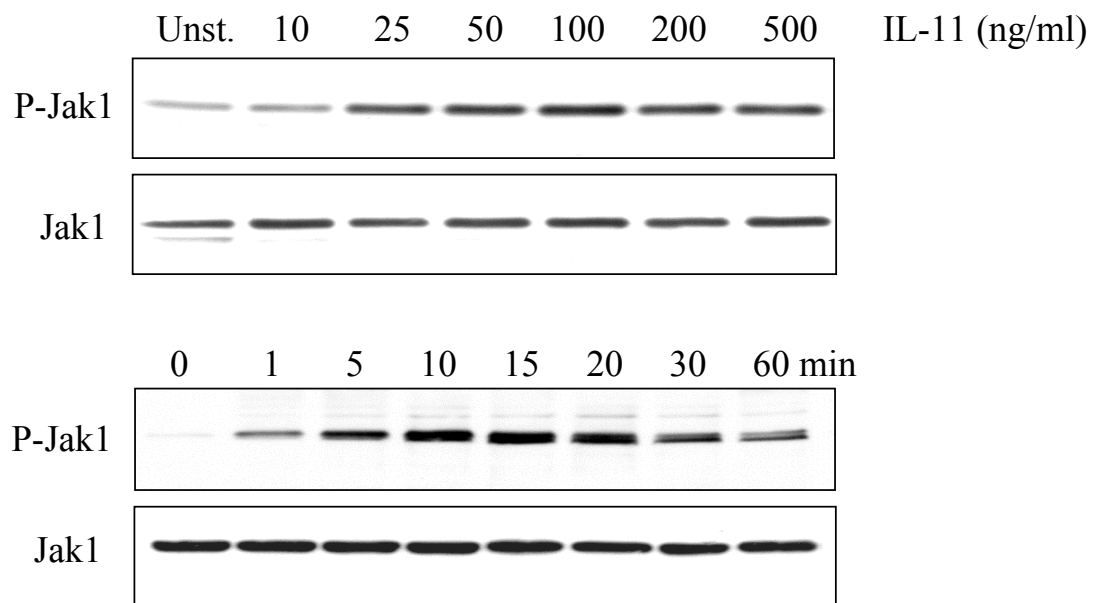


Abbildung IV.15: IL-11 induzierte Aktivierung von Jak1 in HT-29-Zellen. Western Blot an zytosolischem Gesamtprotein aus HT-29. Die Zellen wurden nach Behandlung mit „Hungermedium“ (ohne FCS) für 24 Stunden mit zunehmender Konzentration von rek. IL-11 für 15 min stimuliert, das Gesamtprotein isoliert und 75 µg Protein pro Spur in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zur Detektion von phosphoryliertem Jak1 diente ein polyklonaler Antikörper, der spezifisch die phosphorylierte Form des Proteins erkennt. Dosisabhängige Phosphorylierung von Jak1 (P-Jak1) an den Tyrosinresten 1022/1023. Western Blot der Jak1 Expression als Beladungskontrolle. Kinetik der IL-11 induzierten (100 ng/ml) Jak1 Phosphorylierung in HT-29-Zellen (unten). IL-11 induziert eine dosis- und zeitabhängige Jak1 Phosphorylierung in HT-29-Zellen.

In CEC konnte ebenfalls eine dosisabhängige Jak1 Phosphorylierung nach einer Stimulation mit IL-11 für 15 min gezeigt werden (Abbildung IV.16). Jedoch konnte aufgrund der Apoptosesensitivität dieser Zellen nur eine 2-stündige Behandlung mit „Hungermedium“ durchgeführt werden, so dass die basale Phosphorylierung der Tyrosinkinase Jak1 nicht vollständig unterdrückt werden konnte. Die Jak1 Proteinexpression blieb bei dieser IL-11 Stimulationsreihe unverändert.

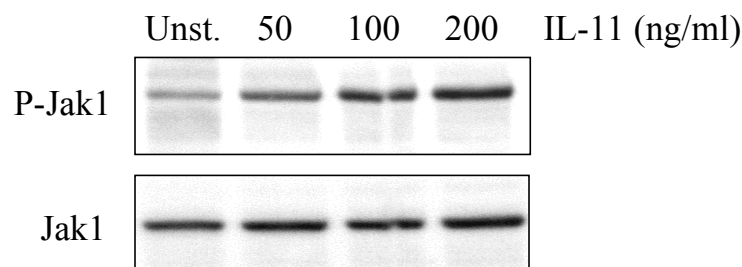


Abbildung IV.16: IL-11 induzierte Aktivierung von Jak1 in CEC. Western Blot von zytosolischem Gesamtprotein aus CEC. Die Zellen wurden mit zunehmender Konzentration von rek. IL-11 für 15 min stimuliert, das Gesamtprotein isoliert und 75 µg Protein pro Spur in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zur Detektion von phosphorylierten Jak1 diente ein polyklonaler Antikörper, der spezifisch die phosphorylierte Form des Proteins erkennt. Dosisabhängige Phosphorylierung von Jak1 (P-Jak1) an den Tyrosinresten 1022/1023. Jak1 Western Blot als Beladungskontrolle. IL-11 induziert dosisabhängig eine Jak1 Aktivierung in CEC.

IV.2.2 STAT3 Phosphorylierung im Western Blot

Nach den Ergebnissen einer dosis- und zeitabhängigen Phosphorylierung von Jak1 in Kolonepithelzellen durch eine Stimulation mit IL-11 folgte die Untersuchung des in der Signalkaskade *downstream* liegenden Transkriptionsfaktors STAT3.

Für diese Versuche wurden die HT-29-Zellen wiederum für 24 Stunden mit „Hungermedium“ vorinkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit ansteigender IL-11 Konzentration für 15 min inkubiert, lysiert und mittels Western Blotting die Phosphorylierung von STAT3 detektiert. Für diese Versuche kam ein polyklonaler Antikörper zum Einsatz, der spezifisch nur die Phosphorylierung von STAT3 am Tyrosinrest 705 erkennt. Abbildung IV. 17 (oben) zeigt den Western

Blot der IL-11-induzierten Aktivierung von STAT3 (P-STAT3) in HT-29-Zellen. Eine Inkubation der Zellen mit ansteigender IL-11 Konzentration induzierte eine dosisabhängige STAT3 Phosphorylierung, mit einer maximalen Aktivierung bei 200 ng/ml IL-11. Die STAT3 Proteinexpression blieb bei der Stimulation mit unterschiedlichen Mengen an IL-11 unbeeinflusst.

Die Zeitkinetik der Aktivierung des Transkriptionsfaktors in HT-29-Zellen mit 100ng/ml IL-11 zeigte eine erhöhte STAT3 Phosphorylierung bereits nach 5 min. Nach 15 min erreichte die Phosphorylierung von STAT3 ein Maximum und klang während der folgenden 45 min wieder ab (Abbildung IV.17, unten). Auch bei dieser Zeitkinetik blieb das STAT3 Proteinniveau unverändert.

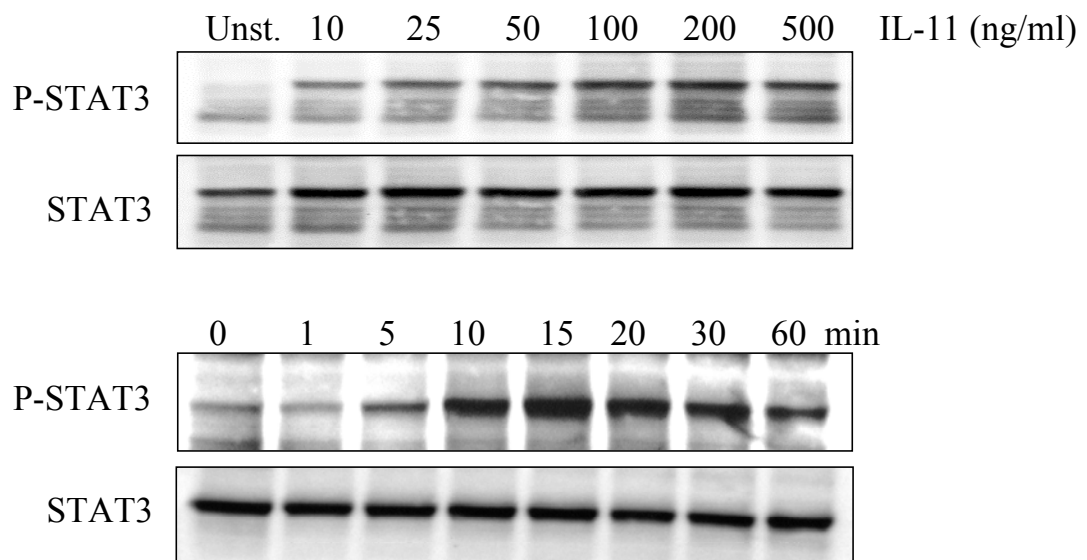


Abbildung IV.17: IL-11 induzierte Aktivierung von STAT3 in HT-29-Zellen. Western Blot an zytosolischem Gesamtprotein aus HT-29-Zellen. Die Zellen wurden nach Behandlung mit „Hungermedium“ (ohne FCS) für 24 Stunden mit steigenden Konzentrationen an rek. IL-11 für 15 min stimuliert, das Gesamtprotein isoliert und 75 µg Protein pro Spur in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zur Detektion von phosphoryliertem STAT3 diente ein polyklonaler Antikörper, der spezifisch die phosphorylierte Form des Proteins erkennt. Dosisabhängige Phosphorylierung von STAT3 (P-STAT3) am Tyrosinrest 705. STAT3 Western Blot als Beladungskontrolle (oben). Kinetik der IL-11 induzierten (100 ng/ml) STAT3 Phosphorylierung an HT-29-Zellen (unten). IL-11 induziert dosis- und zeitabhängige Phosphorylierung von STAT3 in HT-29.

In CEC konnte ebenfalls eine IL-11-induzierte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 gezeigt werden (Abbildung IV.18). Auch hier konnte durch eine auf 2 Stunden beschränkte Behandlung der Zellen mit „Hungermedium“ eine Unterdrückung der basalen Phosphorylierung von STAT3 nicht vollständig erreicht werden. Die STAT3 Proteinexpression blieb bei der IL-11-Stimulation unverändert.

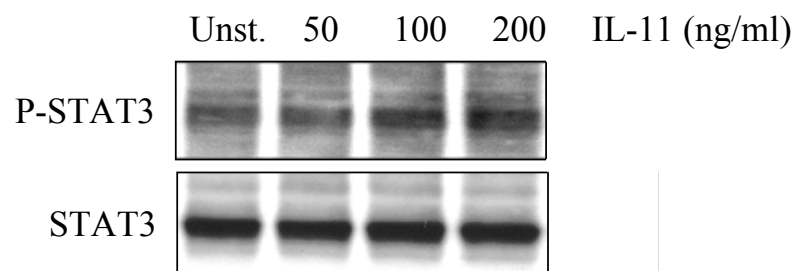


Abbildung IV.18: IL-11 induzierte Aktivierung von STAT3 in CEC. Western Blot an zytosolischem Gesamtprotein. Die Zellen wurden mit zunehmenden Konzentrationen von rek. IL-11 für 15 min stimuliert, das Gesamtprotein isoliert und 75 µg Protein pro Spur in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zur Detektion von phosphoryliertem STAT3 diente ein polyklonaler Antikörper, der spezifisch die phosphorylierte Form des Proteins erkennt. Dosisabhängige Phosphorylierung von STAT3 (P-STAT3) am Tyrosinrest 705. STAT3 Western Blot als Beladungskontrolle. IL-11 induziert dosisabhängig eine STAT3 Aktivierung in CEC.

IV.2.3 STAT3 Phosphorylierung in der Immunhistochemie

Der Nachweis einer IL-11-induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 in Kolonepithelzellen konnten mittels einer immunhistochemischen Färbung an HT-29-Zellen validiert werden. Die Zellen wurden dafür auf Glasobjektträgern kultiviert, für 24 Stunden mit „Hungermedium“ inkubiert und anschließend entweder unbehandelt belassen oder mit 100 ng/ml IL-11 für 30 min stimuliert. Die immunhistochemischen Färbungen der STAT3 Aktivierung erfolgte mit dem polyklonalem anti-Phosphotyrosin (TYR705)-STAT3 Antikörper. Die so markierten Zellen wurden mittels der DAB-Peroxidase Methode braun gefärbt. Abbildung IV.19.B zeigt eine braune, hauptsächlich auf die Zellkerne beschränkte, Färbung der HT-29-Zellen, wenn diese mit 100 ng/ml IL-11 stimuliert wurden. Unstimulierte HT-29 zeigen keine Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 (Abbildung IV.19.A).

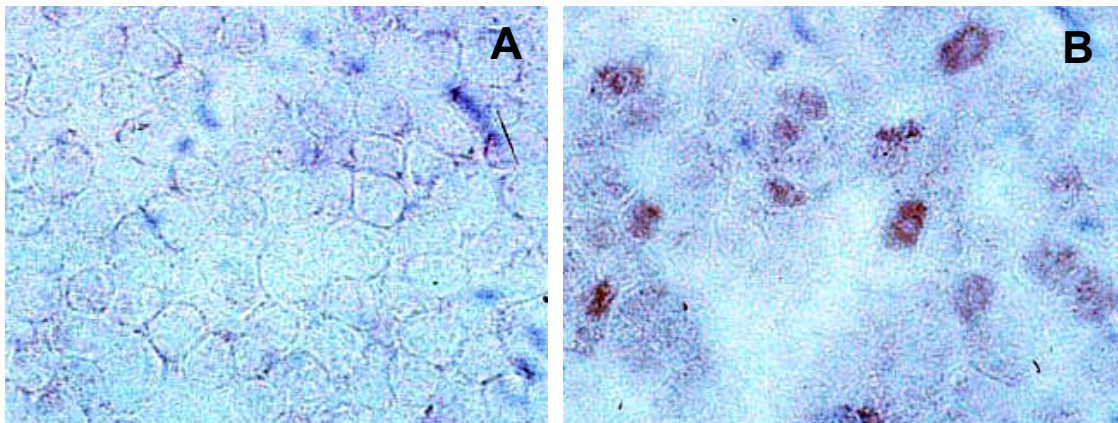


Abbildung IV.19: Immunhistochemische Analyse der IL-11 induzierten STAT3 Phosphorylierung in HT-29-Zellen. Zellen wurden auf Glasobjektträgern kultiviert und entweder unbehandelt belassen oder mit 100 ng/ml IL-11 für 30 min stimuliert. Inkubation mit polyklonalem anti-Phosphotyrosin (TYR705)-STAT3 Antikörper der unstimulierten (A) oder IL-11 stimulierten (B) Zellen. Zunehmende STAT3 Phosphorylierung von HT-29-Zellen nach Stimulation mit IL-11.

IV.3 Analyse möglicher immunmodulatorischer oder zytoprotektiver Effekte von IL-11 in Kolonepithelzellen

Nachdem erstmalig ein Nachweis der funktionellen Expression des IL-11R α auf humanen Kolonepithelzellen gelang, galt unser Interesse einer möglichen immunmodulatorischen oder zytoprotektiven Wirkung von IL-11 in diesen Zellen. Wir fokussierten unsere Untersuchungen dabei auf bereits in anderen Zellarten und Geweben beschriebene anti-inflammatorische, proliferationsinduzierende und anti-apoptotische Einflüsse dieses Zytokins.

IV.3.1 Anti-inflammatorische Einflüsse von IL-11

Unter Berücksichtigung der klinischen Studien bezüglich der immunmodulatorischen und anti-inflammatorischen Eigenschaften einer IL-11-Applikation bei Patienten mit Morbus Crohn, war das primäre Ziel dieser Versuche die durch eine Stimulation mit einem pro-inflammatorischen Agens induzierte Immunantwort mit einer Ko-Stimulation mit IL-11 zu reduzieren oder zu neutralisieren.

IV.3.1.1 Effekte von IL-11 auf die TNF-induzierte IL-8 Sekretion im ELISA

Wir wählten für diese Untersuchungen das Zytokin TNF, welches bei CED als pro-inflammatorischer Stimulus eine wichtige pathogenetische Rolle spielt. Als Vorversuch wurden HT-29-Zellen für 24 oder 48 Stunden mit einer steigenden Konzentration an rek. humanem TNF inkubiert und als *Readout* für die pro-inflammatorische Geninduktion die Sekretion von IL-8 in den Kulturüberstand mit einem spezifischen ELISA bestimmt.

Die Stimulation der Kolonkarzinomzelllinie mit TNF zeigte eine dosisabhängige Sekretion von IL-8 in das Kulturmedium (Abbildung IV.20).

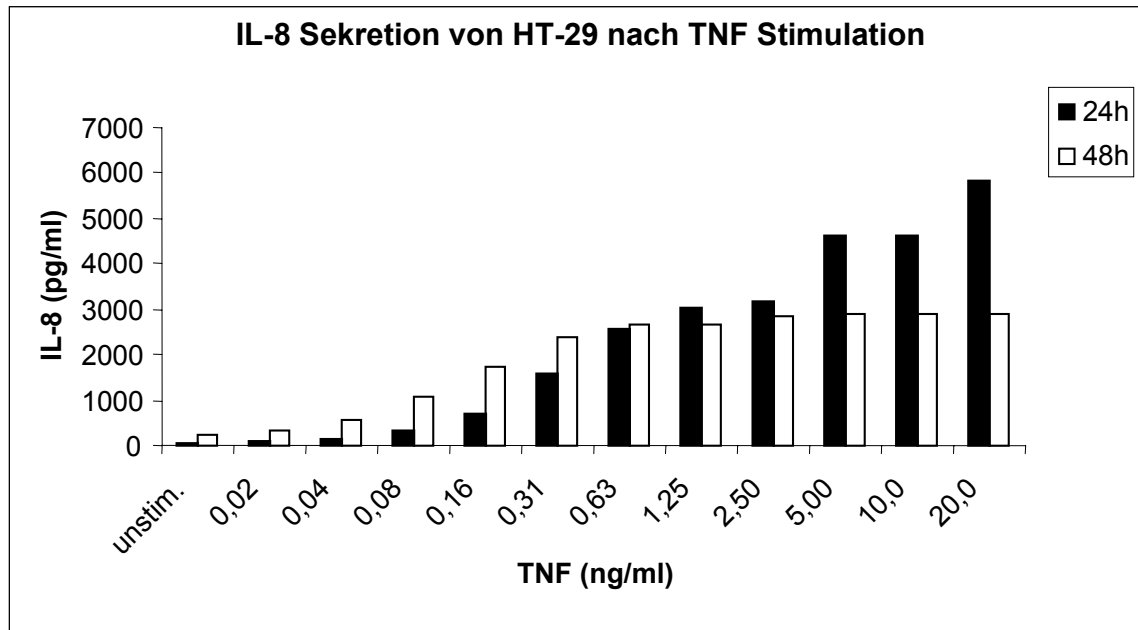


Abbildung IV.20: IL-8 Produktion von HT-29-Zellen nach Stimulation mit TNF. HT-29 wurden mit zunehmender Konzentration an rek. TNF für 24 (schwarz) oder 48 h (weiß) inkubiert. Die Überstände wurden mittels ELISA auf sezerniertes IL-8 untersucht. TNF induziert dosisabhängige IL-8 Sekretion in HT-29.

Bei der Inkubation über 48 Stunden zeigt sich ab einer TNF-Konzentration von 0,63 ng/ml ein Plateau der IL-8 Sekretion. Somit stellte sich der Bereich von 0,5 - 1,0 ng/ml TNF als optimale Stimulationskonzentration heraus, um in der exponentiellen Phase der IL-8 Sekretion über 24 Stunden zu liegen.

Um nun mögliche Einflüsse von IL-11 auf die TNF-induzierte IL-8 Sekretion in HT-29 zu analysieren wurde unter gleichen Bedingungen eine Ko-Inkubation mit 100 ng/ml IL-11 durchgeführt. Abbildung IV.21 zeigt die Dosis-Wirkungskurve dieser Stimulationsreihen im Vergleich zu der TNF-Stimulationsreihen. Eine Ko-Stimulation mit IL-11 bewirkte keine Änderung der TNF-induzierten IL-8 Sekretion in HT-29-Zellen über einen Zeitraum von 24 oder 48 Stunden. Die mittels spezifischen ELISA bestimmten Konzentrationen an sezerniertem IL-8 in das Kulturmedium zeigten keine Unterschiede zu denen im vorhergegangenen Versuch ohne eine IL-11 Ko-Stimulation.

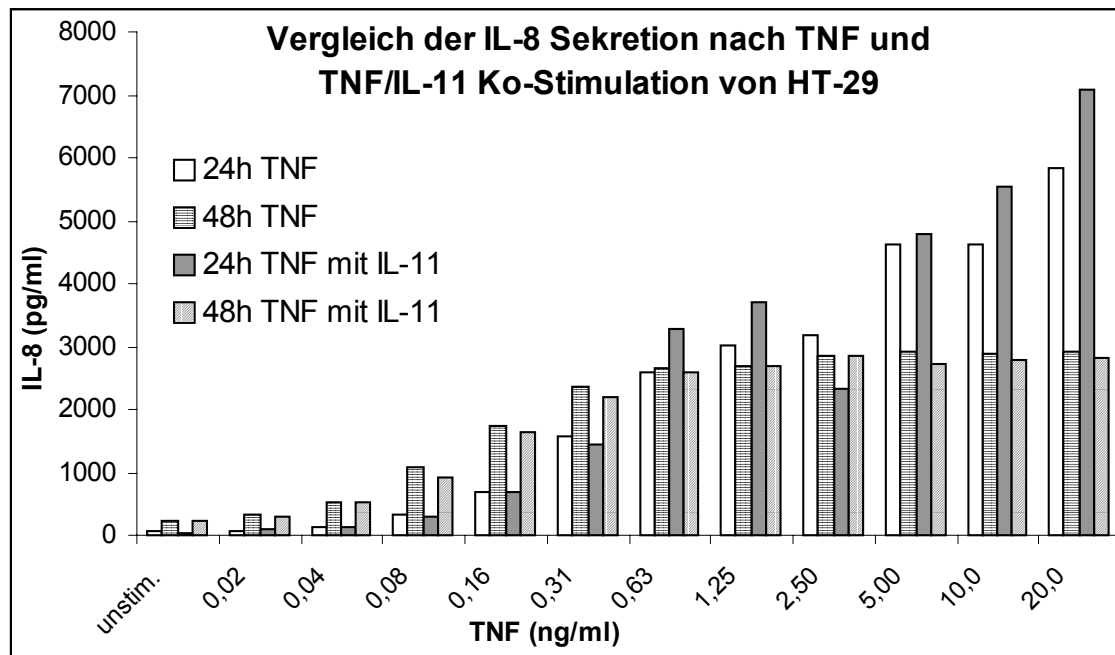


Abbildung IV.21: Vergleich der IL-8 Produktion von HT-29-Zellen nach TNF Stimulation und Ko-Stimulation mit TNF/IL-11. HT-29 wurden mit zunehmender Konzentration an rek. TNF für 24 (weiß) oder 48 h (weiß gestrichelt) stimuliert. Zusätzlich erfolgte eine Ko-Stimulation mit 100 ng/ml rek. IL-11 und zunehmender Konzentration an rek. TNF für 24 (grau) oder 48 Stunden (grau gestrichelt). Die Überstände wurden mittels ELISA auf sezerniertes IL-8 untersucht. Ko-Stimulation von HT-29 mit IL-11 beeinflusst die TNF-induzierte IL-8 Sekretion nicht.

In einem weiteren Ansatz wurden HT-29-Zellen mit variierenden Mengen an IL-11 für 8 Stunden vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 16 Stunden unbehandelt belassen oder durch eine weitere Inkubation von 0,5 ng/ml TNF ko-stimuliert. Die unter diesen Stimulationsbedingungen induzierte Sekretion von IL-8 in den HT-29-Zellkulturüberstand wurde mittels IL-8 ELISA bestimmt (Abbildung IV.22). Eine Vorinkubation der Zellen mit verschiedenen IL-11 Konzentrationen bewirkte ebenfalls keine Inhibierung der folgenden TNF-induzierten IL-8 Sekretion. Vielmehr schien IL-11 einen geringen IL-8 induzierenden Einfluss in HT-29-Zellen zu besitzen.

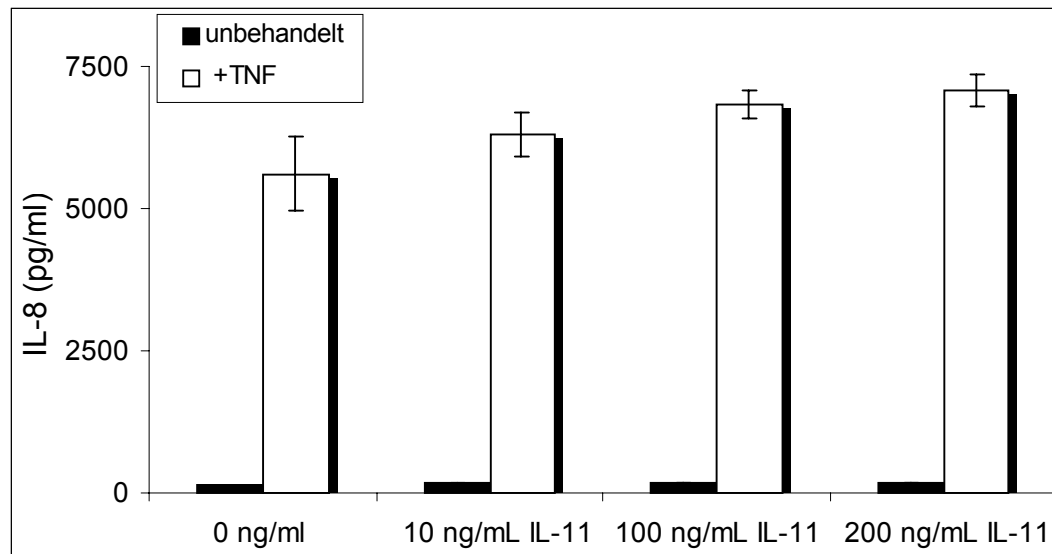


Abbildung IV.22: IL-8 Produktion von HT-29-Zellen nach Vorstimulation mit IL-11 und anschließender TNF-Inkubation. HT-29 wurden mit zunehmender IL-11 Konzentration für 8 Stunden inkubiert. Nach 8 Stunden wurden sie für weitere 16 Stunden entweder mit 0,5 ng/ml TNF ko-stimuliert (weiß) oder verblieben unbehandelt (schwarz). Die Überstände wurden mittels ELISA auf sezerniertes IL-8 untersucht (Daten sind MW aus 3 Messungen \pm SD). Es zeigte sich keine Inhibierung der TNF induzierten IL-8 Sekretion durch Vorstimulation mit IL-11 in HT-29.

Stimulationsversuche in CEC mit den gleichen Bedingungen zeigten ebenfalls keine anti-inflammatorische Wirkung von IL-11 auf die TNF-induzierte IL-8 Sekretion.

IV.3.1.2 I κ B- α Proteinexpression und Degradierung nach TNF Stimulation im Western Blot

In der Literatur finden sich Hinweise auf einen regulatorischen Einfluss von IL-11 auf die Neusynthese von I κ B- α Protein in mononukleären Zellen und dadurch eine Inhibierung der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Durch diese verminderte Induktion NF- κ B-abhängiger, pro-inflammatorischer Zytokine kann IL-11 anti-inflammatorische Einflüsse in diesen Zellen vermitteln. TNF ist der klassische Aktivator des NF- κ B Signalweges durch Induktion einer verstärkten I κ B- α Protein Degradierung. Wir untersuchten deshalb den Einfluss von IL-11 auf die I κ B- α Proteinexpression und die Degradierung des Proteins nach einer Inkubation von HT-29-Zellen mit 1,0 ng/ml TNF. Abbildung IV.23 (oben) zeigt den Western Blot zur Untersuchung des I κ B-

α Proteinexpressionsniveaus in mit 100 ng/ml rek. IL-11 für die angegebenen Zeiten stimulierten HT-29-Zellen. Die Inkubation über einen Zeitraum von 24 Stunden zeigte keinen Einfluss auf die $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ Proteinsynthese. Als Beladungskontrolle diente ein Western Blot für das Housekeeping-Protein β -Aktin (Abbildung IV.23, unten). Eine anschließende Stimulation der verschiedenen Ansätze mit 1,0 ng/ml TNF für weitere 15 min induzierte eine Degradierung von $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ Protein (Abbildung IV.23, oben). Eine Vorstimulation der Zellen mit 100 ng/ml IL-11 für verschiedene Zeiten inhibierte die TNF-induzierte Degradierung von $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ nicht.

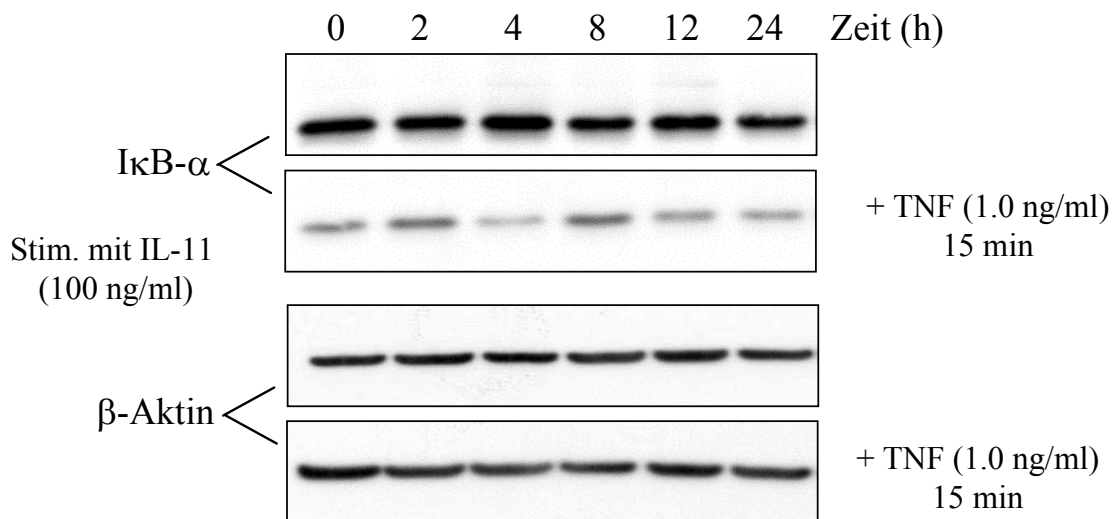


Abbildung IV.23: Western Blot Analyse zum Einfluss von IL-11 auf die $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ Protein-Expression und Degradierung nach TNF Stimulation in HT-29-Zellen. Die Zellen wurden mit 100 ng/ml IL-11 für die angegebene Zeit inkubiert und dann für weitere 15 min entweder mit 1,0 ng/ml TNF stimuliert oder blieben unbehandelt. Das zytosolische Gesamtprotein wurde isoliert und 30 μg Protein pro Spur mittels eines 10%igen SDS-Polyacrylamidgels aufgetrennt. $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ Protein (oben) und Degradierung von $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ in den TNF behandelten HT-29-Zellen (unten) wurden mittels Western Blot mit monoklonalem anti- $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ Antikörper bestimmt. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis des Housekeeping-Proteins β -Aktin. Kein anti-inflammatorischer Einfluss von IL-11 auf die $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ Proteinneusynthese und Degradierung in TNF inkubierten HT-29-Zellen.

IV.3.1.3 IL-11R α Expression nach Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen in der Durchflusszytometrie

Nachdem unsere Experimente keine anti-inflammatorischen Einflüsse einer IL-11-Inkubation auf die NF- κ B abhängige Signaltransduktion in Kolonepithelzellen zeigten, galten die folgenden Experimente der IL-11R α Expression in Abhängigkeit einer Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen. Hierfür wurden HT-29-Zellen für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an rek. TNF oder IL-1 β inkubiert und anschließend die IL-11R α -Zelloberflächenexpression durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung IV.24 zeigt eine dreidimensionale Histogrammdarstellung der jeweiligen Stimulationsansätze (weiß) und einer IgG1 Isotypkontrolle als Negativkontrollfärbung (grau). Eine Stimulation der HT-29-Zellen mit variierenden Konzentrationen dieser beiden pro-inflammatorischen Zytokine über 24 Stunden bewirkte keine Veränderung des IL-11R α Expressionsniveaus auf der Zelloberfläche gegenüber unbehandelten Zellen. Das Zytokin IL-11 induzierte keine Regulation der IL-11R α -Expression unter diesen Bedingungen.

Untersuchungen bezüglich der IL-11R α mRNA Expression in frisch isolierten CEC aus Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa im Vergleich zu Kontrollpatienten ergaben auch hier keine unterschiedliche Regulation auf Transkriptionsebene.

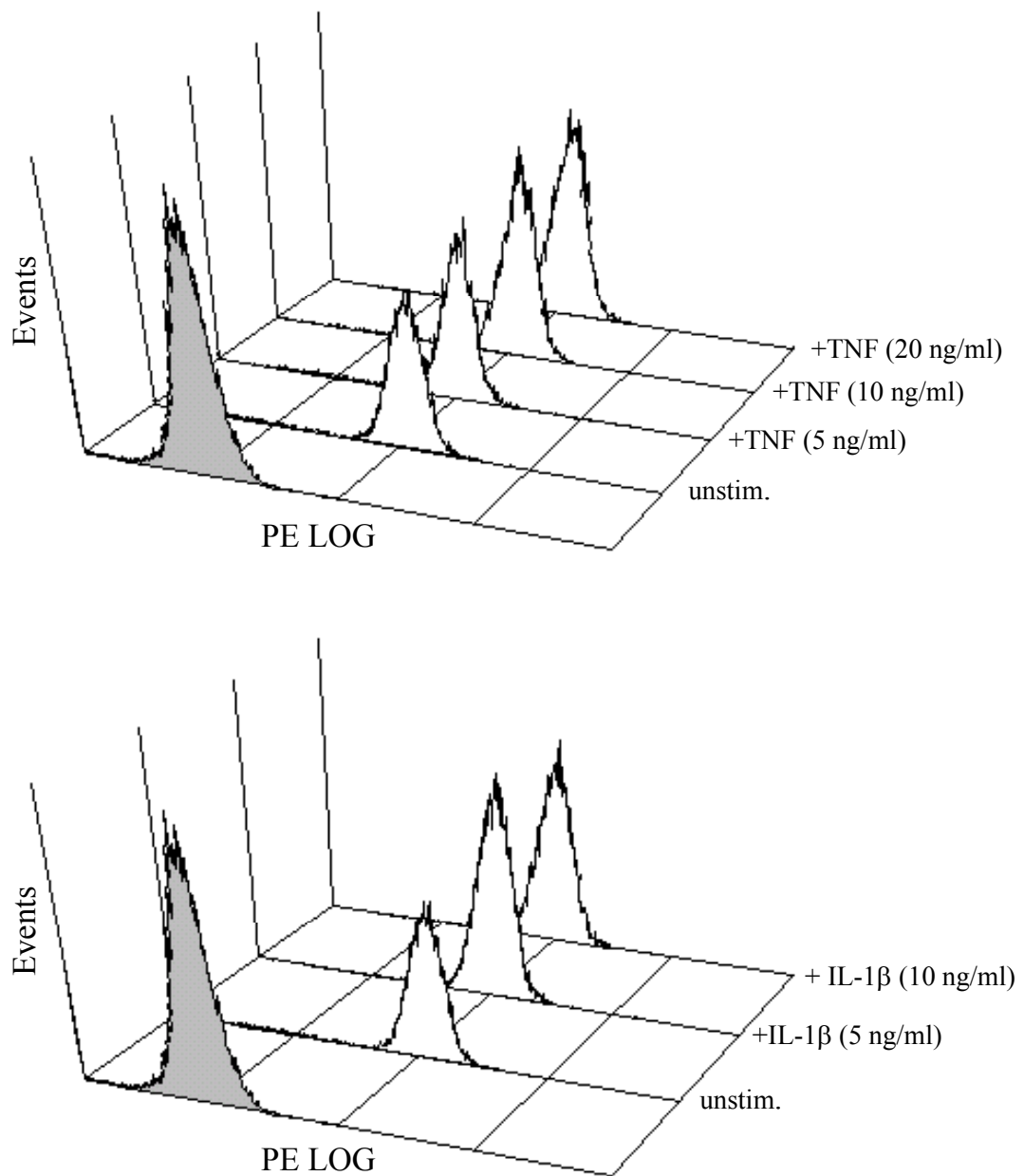


Abbildung IV.24: IL-11R α Zelloberflächenexpression nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen an TNF und IL-1 β auf HT-29-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h inkubiert und anschließend markiert. Durchflusszytometrische Analyse der IL-11R α Zelloberflächenexpression (weiß) mit ansteigender Konzentration an rek. TNF (oben) und IL-1 β (unten). IgG1 Isotypkontrolle als Negativkontrolle (grau). Die Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen zeigte keine Wirkung auf die IL-11R α Expression in HT-29-Zellen.

IV.3.2 Proliferationsinduzierende Effekte von IL-11

Die weiteren Analysen dienten der Untersuchung möglicher proliferationsinduzierender Einflüsse einer IL-11 Inkubation in Kolonepithelzellen. Das Zytokin IL-11 zeigt in diversen Zelllinien eine Beeinflussung des Zellzyklus und damit Effekte auf das Proliferationsverhalten der Zellen [74,94].

IV.3.2.1 MTS-Viabilitätstest

Um proliferationsinduzierende Effekte einer Kultur von HT-29-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL-11 zu untersuchen, wurden die Zellen in verschiedenen Zelldichten in 96-well-Mikrotiterplatten (log₂ Verdünnung) ausgesät und entweder unbehandelt oder mit ansteigenden IL-11 Konzentrationen inkubiert. Nach 48 h wurde die Vitalität der Zellen mittels MTS-Test bestimmt, um auf diese Weise einen Rückschluss auf die momentane Zellzahl zu bekommen. Abbildung IV.25 zeigt die Absorption des Substrates bei 490 nm in den unterschiedlichen Ansätzen. Die gemessene Absorption ist direkt proportional zur Anzahl der stoffwechselaktiven Zellen in dem entsprechenden Well und kann somit als ein Parameter für das Proliferationsverhalten der Zellen über den untersuchten Zeitraum angesehen werden. Eine Kultivierung der HT-29-Zellen mit variierender Konzentration an IL-11 und unterschiedlicher Zelldichten über 48 Stunden hatte keinen eindeutigen Einfluss auf die Zellviabilität.

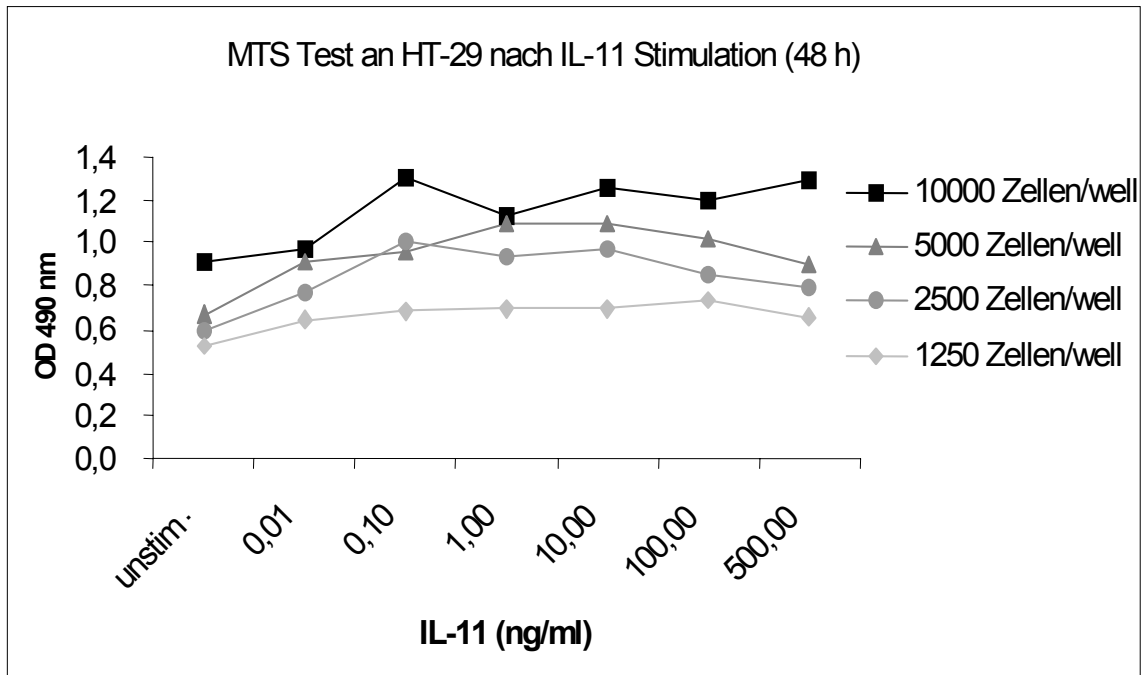


Abbildung IV.25: MTS-Viabilitätstest an HT-29-Zellen nach IL-11 Stimulation. HT-29 wurden in verschiedenen Zelldichten (log2 Verdünnung) in 96-well-Mikrotiterplatten ausgesät und mit ansteigender Konzentration an rek. IL-11 inkubiert. Nach 48 h wurde die Zellviabilität mittels MTS-Test am ELISA-Reader bei einer Absorption (OD) von 490 nm gemessen. Eine IL-11 Inkubation von HT-29 für 48 h hat keinen eindeutigen Einfluss auf die Zellviabilität.

IV.3.2.2 Durchflusszytometrische Zellzyklus-Analyse

Proliferierende Zellen in der exponentiellen Phase des Wachstums befinden sich zu einem hohen Anteil in der S- bzw. G2/M-Phase Phase des Zellzyklus. Durch eine Färbung der Zellen mit Propidiumiodid (PI), einen DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff, lässt sich der DNA-Gehalt einer Zelle durchflusszytometrisch analysieren und sich somit ihrer Position im Zellzyklus feststellen. Anhand dieser Befunde untersuchten wir den Einfluss einer IL-11 Stimulation von HT-29-Zellen auf die Zellzyklusphasen durchflusszytometrisch. Um die Genauigkeit der Messung zu optimieren, erfolgte die statistische Auswertung der Zellzyklusphasen mittels der Software MultiCycle der Firma Becton Dickinson. In das DNA-Histogramm wurden drei „Fitfunktionen“ eingepasst, stellvertretend für die G1-, S-, und G2/M-Population. Die Flächen unter den Kurven wurden integriert und die prozentualen Anteile der Phasen berechnet. Abbildung IV.26 zeigt exemplarisch eine statistische Auswertung eines Histogramms von PI gefärbten HT-29-Zellen.

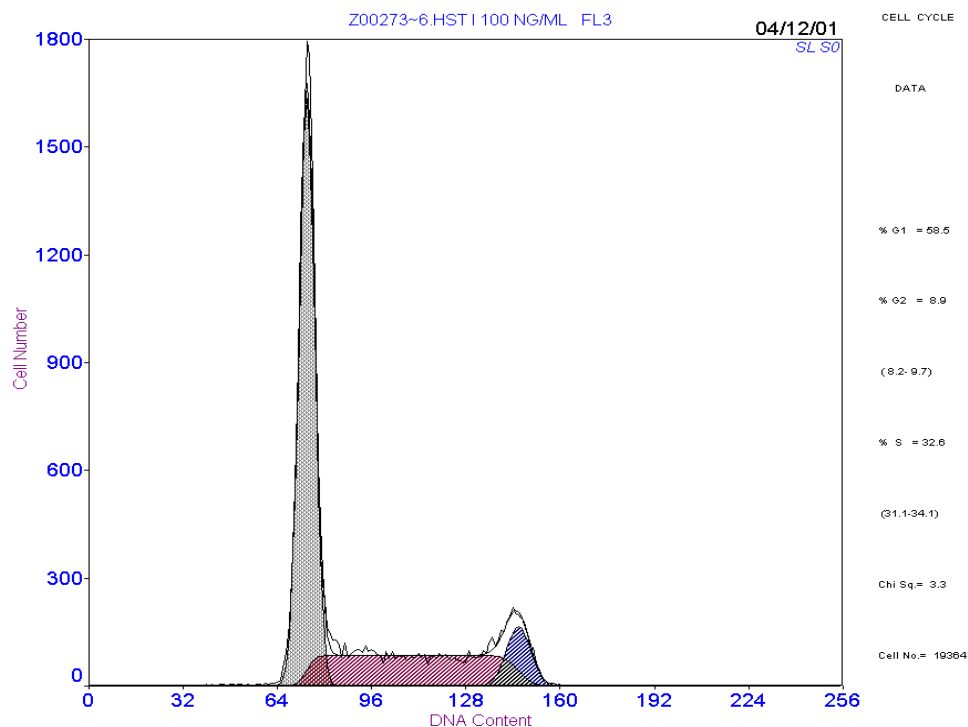


Abbildung IV.26: Exemplarische Darstellung der statistischen Auswertung der Zellzyklus-Analyse von HT-29 mittels der Software MultiCycle (Becton Dickinson, Heidelberg). Histogramm Darstellung der PI-Färbung (DNA Content): G1-Phase (grau), S-Phase (violett), G2/M-Phase (blau). Prozentuale Angabe der Zellzyklusphasen rechts.

Die Zellen wurden für die Versuche im subkonfluenten oder konfluenten Wachstumszustand mit ansteigender IL-11 Konzentration in 6-well Kulturplatten für 48 Stunden kultiviert und anschließend nach einer Permeabilisierung der Zellmembran mit PI gefärbt. Die durchflusszytometrische DNA-Analyse und statistische Zellzyklus-Auswertung erfolgten wie oben beschrieben. Abbildung IV.27 zeigt die graphische Auswertung des prozentualen S-Phasen Anteils der Inkubation mit verschiedenen IL-11-Konzentrationen von HT-29-Zellen im subkonfluenten (grau) und konfluenten Wachstumszustand (weiß). Es zeigte sich kein Unterschied in den Mittelwerten der einzelnen Stimulationsansätzen. Im subkonfluenten Wachstumszustand, in der exponentiellen Phase des Zellwachstums, lag der S-Phasen Anteil bei ca. 31%. Durch die Kontaktinhibierung der adhären wachsenden HT-29-Zellen im konfluenten Plateauwachstumszustand zeigten diese einen signifikanten Rückgang des S-Phasen-Anteils auf nur noch ca. 19%.

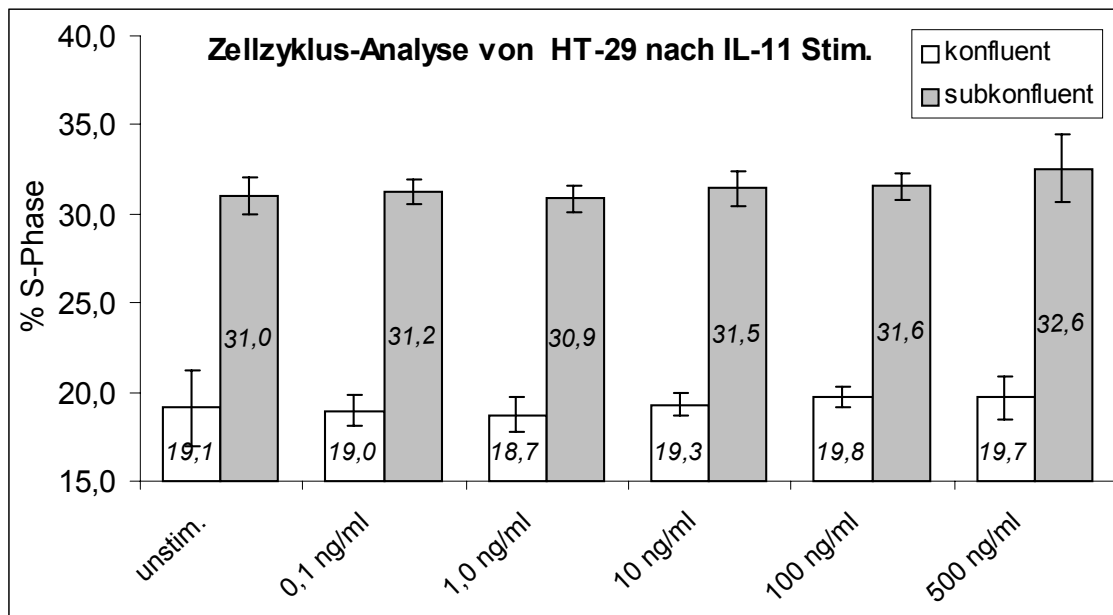


Abbildung IV.27: Graphische Darstellung des prozentualen S-Phasen Anteils von kultivierten HT-29-Zellen in Abhängigkeit der IL-11 Konzentration. Subkonfluenten Wachstumszustand (grau) zeigt die exponentielle und der konfluente Wachstumszustand (weiß) die Plateauwachstumsphase. Kein Einfluss einer IL-11 Inkubation auf das Proliferationsverhalten von HT-29-Zellen detektierbar.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Zellzyklus-Analyse präzisierten die nicht eindeutigen Ergebnisse aus den Versuchen mit dem MTS-Viabilitätstest. Sie demonstrierten, dass eine IL-11 Stimulation der HT-29-Zellen keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten dieser Zellen zeigte.

IV.3.3 Anti-apoptotische Effekte von IL-11

Ein immunmodulatorischer oder proliferativer Effekt einer IL-11 Stimulation in Kolonepithelzellen konnte in dieser Arbeit bisher trotz einer funktionellen Signaltransduktion über den JAK/STAT Signalweg nicht gezeigt werden. Als ein weiterer diskutierter zytoprotektiver Effekt der IL-11 Stimulation, kam ein anti-apoptotischer Einfluss in Frage. Die Mitglieder aus der STAT-Familie wurden vor kurzem als direkte Regulatoren der Bcl-2-Genfamilie, die als zentrale Proteine der Apoptoseregulation fungieren, beschrieben [95]. Die Expression dieser anti-apoptotischen Proteine wird durch diverse Stimulanzien, unter anderem Zytokine aus der IL-6-Typ-Familie hochreguliert und führt dadurch zur Induktion von Überlebenssignalen in den Zielzellen.

IV.3.3.1 Bcl-2 Expression im Western Blot

Die Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie spielen in der Regulierung der mitochondrial ablaufenden Apoptoseprozesse eine tragende Rolle. Das pro-apoptotische Mitglied dieser Familie „Bad“ löst Apoptose aus, während sein natürlicher Antagonist, das anti-apoptotische Protein Bcl-2, als Suppressor des programmierten Zelltodes gilt. Mitglieder aus der Bcl-2 Familie werden in den Epithelzellen der Krypten des Kolons exprimiert [18]. Daher wurde im Folgenden das Expressionsmuster des Bcl-2 Proteins in Kolonepithelzellen nach einer Stimulation mit IL-11 untersucht.

Wie der Western Blot an der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 hinsichtlich der Expression dieses Apoptoseproteins ergab, zeigten diese Zellen weder eine konstitutive Bcl-2 Protein Expression noch eine Induktion der Expression durch eine Inkubation für 24 h mit variierenden Mengen an IL-11 (Abbildung IV.28). Die Beladungskontrolle mittels β -Aktin Western Blot garantierte die Integrität des Gesamtproteins im Zelllysat.

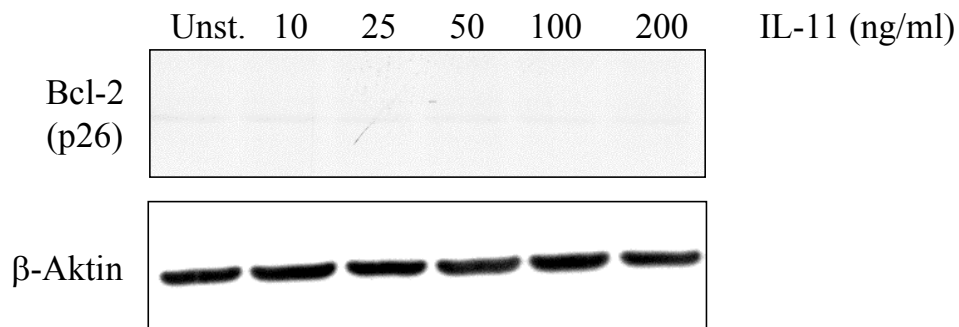


Abbildung IV.28: Bcl-2 Proteinexpression in HT-29-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit zunehmender Konzentration an rek. IL-11 inkubiert, das Gesamtprotein isoliert und 50 µg Protein pro Spur in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Western Blot mit monoklonalem anti-Bcl-2 Antikörper (oben). Als Beladungskontrolle diente der Nachweis des Housekeeping-Proteins β-Aktin (unten). HT-29 exprimierten kein Bcl-2 Protein und die Expression war nicht durch eine IL-11 Inkubation induzierbar.

Die fehlende Expression von Bcl-2 in der kolorektalen Karzinomzelllinie HT-29 veranlasste uns zur Bcl-2 Proteinanalyse in CEC. Frisch isolierte Epithelzellen wurden h mit unterschiedlichen Konzentrationen an IL-11 auf Kollagen beschichteten Filtereinsätzen für 24 h kultiviert und anschließend auf die Proteinexpression von Bcl-2 hin untersucht. Abbildung IV.29 verdeutlicht eine konstitutive Proteinexpression in den CEC. IL-11 induzierte in diesen Zellen eine Hochregulation des anti-apoptotischen Bcl-2 Proteins. Als Beladungskontrolle diente ein β-Aktin Western Blot.

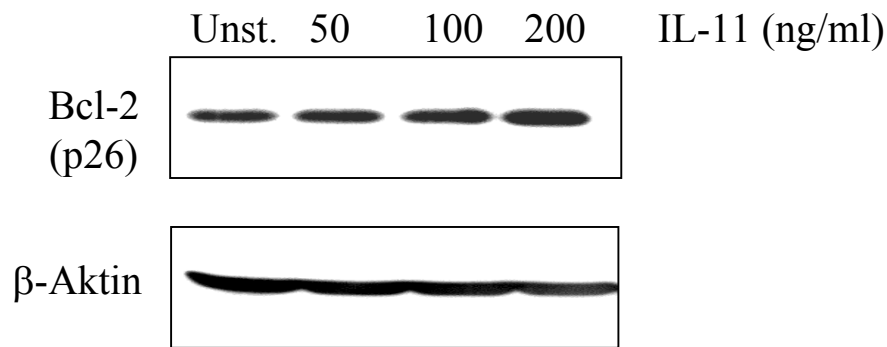


Abbildung IV.29: *Bcl-2* Proteinexpression in CEC. Die Zellen wurden für 24 h mit zunehmenden Konzentrationen an rek. IL-11 inkubiert, das Gesamtprotein isoliert und 50 μ g Protein pro Spur in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Western Blot mit monoklonalem anti-Bcl-2 Antikörper (oben). Als Beladungskontrolle diente der Nachweis des Housekeeping-Proteins β -Aktin (unten). IL-11 induzierte eine Steigerung der *Bcl-2* Proteinsynthese in CEC.

IV.3.3.2 Akt-Phosphorylierung im Western Blot

Ein weiteres Schlüsselprotein, involviert in der anti-apoptotischen Signalkaskade, stellt die Proteinkinase B (PKB) oder Akt dar. Diese Serin-Threoninkinase ist als zentrales Protein an vielen Signalweiterleitungen beteiligt und wird durch diverse Wachstumsfaktoren aktiviert. Nach einer Phosphorylierung *downstream* zu der Lipidkinase, Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI 3-Kinase), wird die Proteinkinase am Threoninrest 308 und Serinrest 473 phosphoryliert und vermittelt anschließend als eine Art Schlüsselenzym eine Vielzahl von Überlebenssignalen innerhalb der jeweiligen Zielzellen. Nächstes Ziel dieser Arbeit war daher die Analyse der IL-11-abhängigen Aktivierung dieser Proteinkinase in Kolonepithelzellen.

Für die Untersuchungen zur Aktivierung von Akt in Abhängigkeit einer Inkubation mit IL-11 wurden HT-29-Zellen für 24 Stunden mit „Hungermedium“ (ohne FCS) inkubiert, um das basale Phosphorylierungsniveau in den Zellen zu reduzieren. Anschließend erfolgte die Stimulation mit verschiedenen IL-11 Konzentrationen für 30 min. Nach Lyse der Zellen wurde das isolierte Gesamtprotein mittels Western Blotting auf phosphoryliertes Akt analysiert. Für diese Versuche kam ein polyklonaler Antikörper zum Einsatz, der spezifisch nur die am Serinrest 473 phosphorylierte Form des Proteins detektiert. In Abbildung IV. 30 (oben) ist der Western Blot zur IL-11-induzierten Aktivierung von Akt (P-Akt) in HT-29-Zellen gezeigt. Eine Inkubation der Zellen mit ansteigender IL-11 Konzentration induzierte eine dosisabhängige Akt Phosphorylierung mit einer maximalen Aktivierung bei 200 ng/ml IL-11. Die Akt Proteinexpression blieb bei dieser Stimulationsreihe unbeeinflusst.

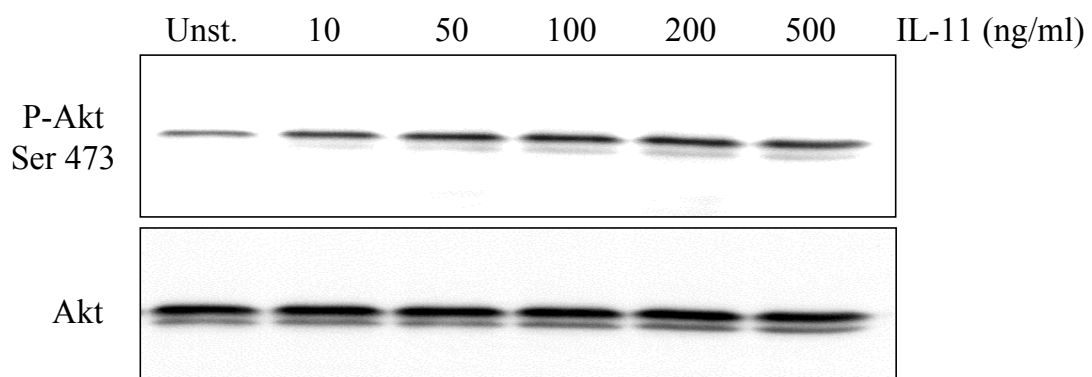


Abbildung IV.30: IL-11 induzierte Aktivierung von Akt in HT-29-Zellen. Western Blot an zytosolischem Gesamtprotein aus HT-29-Zellen. Die Zellen wurden nach Behandlung mit „Hungermedium“ (ohne FCS) für 24 h mit zunehmenden Konzentrationen an rek. IL-11 für 30 min stimuliert, das Gesamtprotein isoliert und 100 µg Protein pro Spur in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zur Detektion von aktiviertem Akt diente ein polyklonaler Antikörper, der spezifisch nur die phosphorylierte Form des Proteins erkennt. Dosisabhängige Phosphorylierung von Akt (P-Akt) am Tyrosinrest 473 (oben). Der Akt Western Blot diente als Beladungskontrolle (unten). IL-11 induziert eine dosisabhängige Phosphorylierung von Akt in HT-29-Zellen.

In CEC konnte ebenfalls eine dosisabhängige Akt Phosphorylierung am Serinrest 473 nach einer Stimulation für 30 min mit ansteigenden IL-11 Konzentrationen gezeigt werden (Abbildung IV.31). Jedoch konnte aufgrund der Apoptosesensitivität dieser Zellen nach dem Verlust der Zellverankerung nur eine 2-stündige Behandlung mit „Hungermedium“ durchgeführt werden, so dass die basale Phosphorylierung nicht vollständig unterdrückt werden konnte. Die Zunahme der aktivierten Form der Proteinkinase fällt geringer aus als in der Kolonkarzinomzelllinie. Sie zeigt allerdings ein erkennbares Maximum bei 100 ng/ml IL-11. Die Akt Proteinexpression blieb unter diesen Stimulationsbedingungen unverändert.

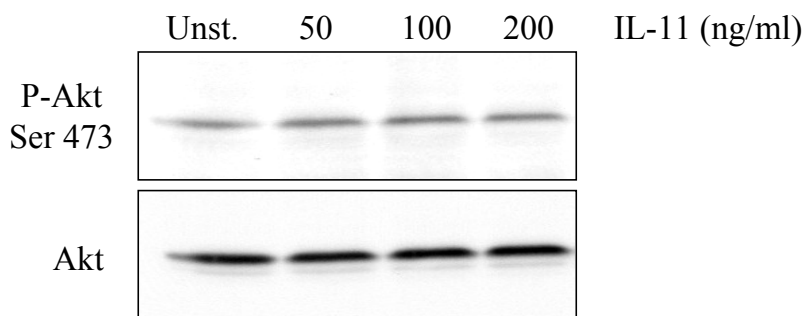


Abbildung IV.31: IL-11 induzierte Aktivierung von Akt in CEC. Western Blot an zytosolischem Gesamtprotein. Die Zellen wurden mit zunehmenden Konzentrationen an rek. IL-11 für 30 min stimuliert, das Gesamtprotein isoliert und 100 µg Protein pro Spur in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zur Detektion von aktiviertem Akt diente ein polyklonaler Antikörper, der spezifisch nur die phosphorylierte Form des Proteins erkennt. Dosisabhängige Phosphorylierung von Akt (P-Akt) am Serinrest 473. Der Akt Western Blot diente als Beladungskontrolle. IL-11 induziert eine dosisabhängige Akt Phosphorylierung in CEC.

Diese Versuchsreihen verdeutlichten einen Effekt *downstream* zur Jak/STAT-Signaltransduktion, induziert durch eine Inkubation der Kolonepithelzellen mit IL-11. Durch eine Phosphorylierung von Akt konnte erstmals die Induktion eines anti-apoptotischen Signals durch eine IL-11-Stimulation in Kolonepithelzellen gezeigt werden.

IV.3.3.3 Fluorometrischer Nachweis der Caspase-9 Aktivität in primären humanen Kolonepithelzellen

Da die Daten auf eine Aktivierung von Akt durch eine IL-11 Stimulation in Kolonepithelzellen hinwiesen, wurden in den folgenden Versuchen in Frage kommende *Downstream*-Substrate dieser Proteinkinase analysiert. Unter den bis heute bekannten Akt-Substraten dürfte, hinsichtlich einer anti-apoptotischen Signalweiterleitung, die durch Phosphorylierung am Serinrest 196 eingeleitete Inhibierung der Caspase-9 eine bedeutende Rolle spielen.

CEC unterliegen nach der Ablösung von der Matrix, einer durch Ablösung von der Verankerungsmatrix induzierten Form der Apoptose, der sogenannten „Anoikis“. Diese verläuft unter Beteiligung der Caspasenkaskade [23,96]. So entwickelte sich als nächste Fragestellung die Untersuchung der Caspasen-9 Aktivierung von in Suspension gehaltenen, isolierten CEC, die entweder unbehandelt belassen oder mit IL-11 vorstimuliert wurden. Abbildung IV.32 zeigt den fluorometrischen Nachweis der Caspase-9 Aktivität in IL-11 behandelten (100ng/ml) und unbehandelten Zellen. Dieser Versuchsansatz zeigte eine verminderte Caspase-9 Aktivierung nach einer 30-minütigen Vorinkubation der Zellen mit 100 ng/ml IL-11.

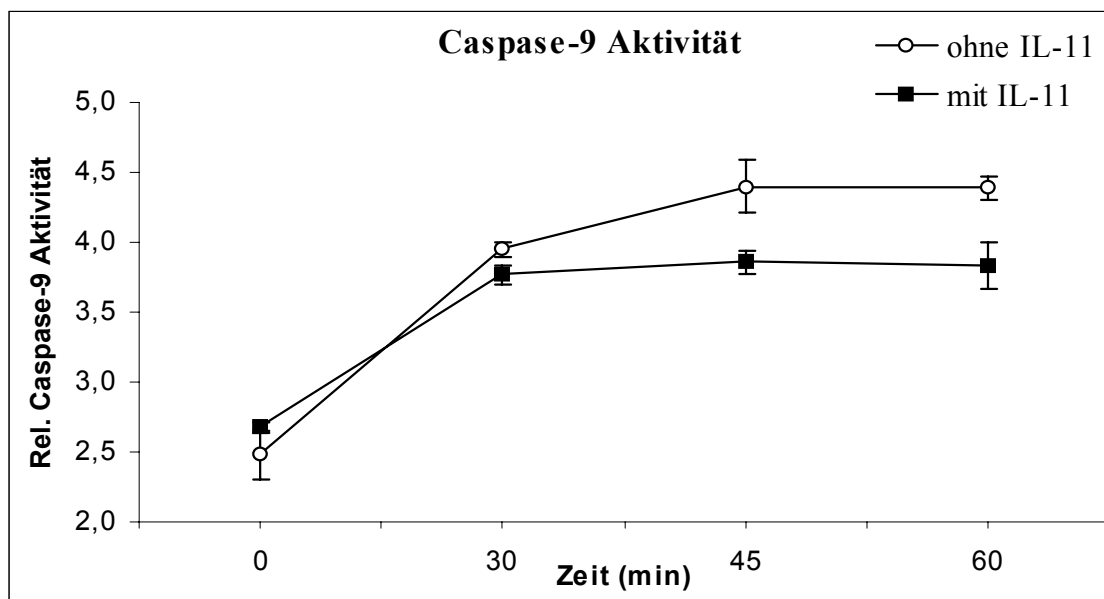


Abbildung IV.32: Fluorometrischer Nachweis der Caspase-9 Aktivierung in CEC. Frisch isolierte Epithelzellen wurden mit Dispase vereinzelt und mit 100 ng/ml IL-11 stimuliert oder unbehandelt belassen. Die Zellen wurden anschließend in einem Eppendorf-Gefäß zentrifugiert, 30 min im Pellet inkubiert und anschließend nach kräftigem Vortexen durch Schütteln bei 37 °C für die angegebenen Zeiten in Suspension gehalten. Unmittelbar nach Ende der Inkubationszeit wurden zytosolische Extrakte hergestellt. 10 µg Protein wurden gemäß den Angaben des Herstellers mit dem Caspase-9 spezifischen Substrat (LEHD-AFC) bei 37 °C inkubiert und die Aktivität der Caspase-9 fluorometrisch bestimmt (Daten sind $MW \pm SD$). IL-11 Stimulation von isolierten CEC inhibiert die Caspase-9 Aktivität.

IV.3.3.4 Zellverankerungsabhängige Apoptose von primären humanen Kolonepithelzellen in der Durchflusszytometrie

Als weiteren funktionellen Nachweis eines anti-apoptotischen Einflusses der IL-11 Stimulation in Kolonepithelzellen diente die durchflusszytometrische Bestimmung der apoptotischen Zellen, von in Suspension gehaltenen, isolierten CEC, nach einer Inkubation mit IL-11. Die Zellen wurden für 30 min entweder mit 100 ng/ml IL-11 vorinkubiert oder unbehandelt belassen und anschließend durch Schütteln auf 37 °C für 2 h in Suspension gehalten. Anschließend wurde der Prozentsatz an apoptotischen Zellen mittels PI-Markierung der DNA und der Entstehung des prä-G1-peaks nachgewiesen. Die Versuchsreihe zeigte eine Reduzierung des Anteils der apoptotischen Zellen infolge einer IL-11-Vorinkubation von 73 auf 66% (Abbildung IV.33).

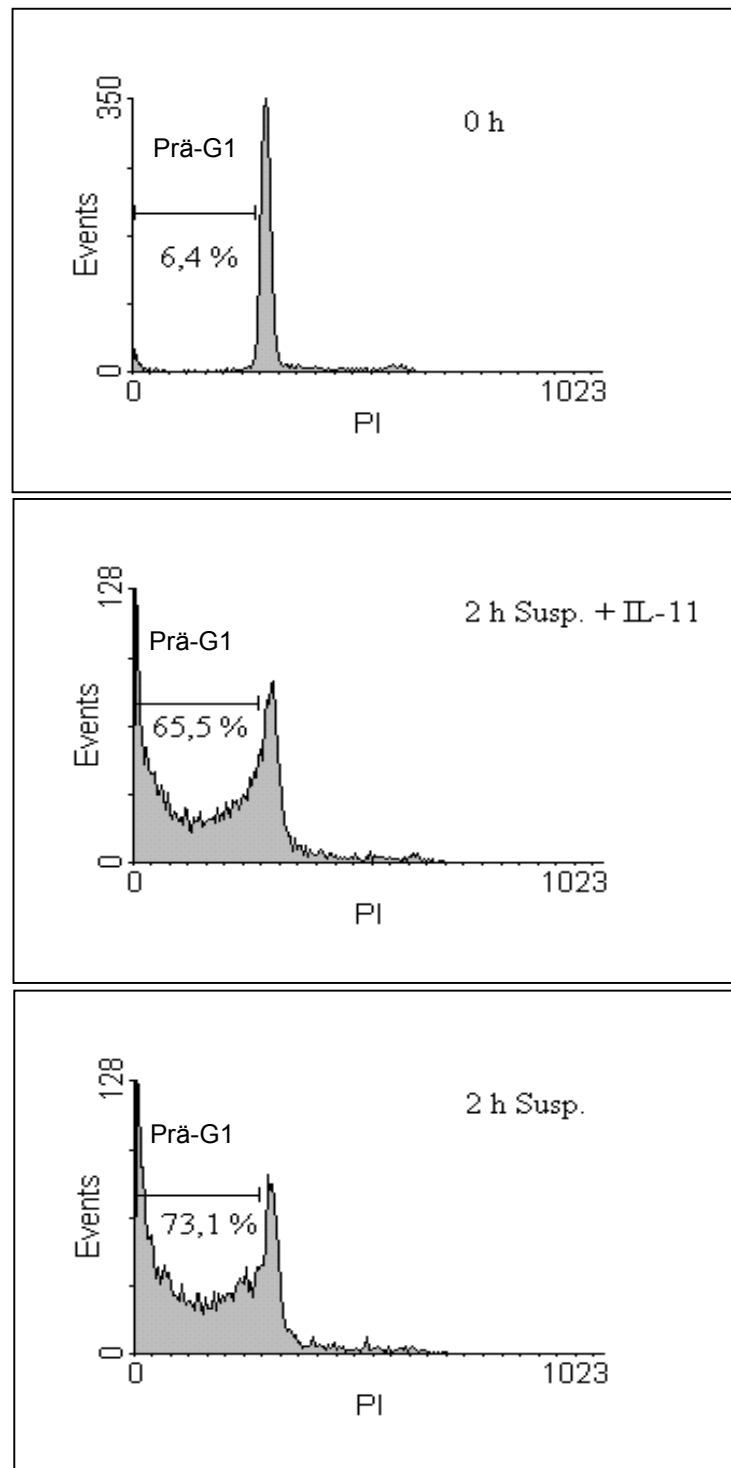


Abbildung IV.33: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptose von in Suspension gehaltenen CEC nach IL-11 Inkubation. Frisch isolierte CEC wurden mit Dispase vereinzelt und mit 100 ng/ml IL-11 stimuliert oder unbehandelt belassen. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert, 30 min im Pellet belassen und nach kräftigem Vortexen durch Schütteln bei 37 °C für 2 h in Suspension gehalten. Die Induktion der Apoptose wurde durchflusszytometrisch mittels PI-Markierung der DNA und Entstehung des prä-G1-peaks nachgewiesen. Angabe der apoptotischen Zellen in Prozent. Unbehandelte Zellen unmittelbar vor der Suspensionsinkubation ($t = 0$ h) dienen als Kontrolle. Eine IL-11 Inkubation von isolierten CEC reduziert die durch Suspensionsinkubation induzierte Apoptose.

V DISKUSSION

Neben seiner hämatopoetischen Aktivität zeigt das pleiotrope Zytokin IL-11 ein vielfältiges Spektrum an weiteren zellbiologischen Wirkungen. Unser Interesse fokussierte sich auf die in Tiermodellen nachgewiesenen anti-inflammatorischen und zytoprotektiven Effekte von IL-11 bei verschiedenen Arten der Schädigung der Kolonmukosa. Aufgrund dieser Eigenschaften empfahl sich ein Einsatz bei der Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), was unter Beteiligung der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I der Universitätsklinik Regensburg im Rahmen einer Phase III Multizenterstudie untersucht wird. Die Daten aus prä-klinischen *in vivo* und *in vitro* Studien lassen immunmodulatorische Eigenschaften von IL-11 durch eine Inhibierung pro-inflammatorischer Mediatoren vermuten. So konnte für aktivierte Makrophagen eine Reduzierung von TNF, IL-12, IL-1, und NO und für aktivierte T-Zellen eine Verminderung von IFN γ und IL-2 unter IL-11 Einfluss gezeigt werden [51,59-61].

Die Wirkung dieses multifunktionalen Zytokins beschränkt sich auf Zellen, die den IL-11R α und die signaltransduzierende Untereinheit gp130 auf ihrer Oberfläche aufweisen. Allerdings lagen bisher für die Proteinexpression der α -Kette des Rezeptors innerhalb der humanen Kolonmukosa keine Daten vor. Es konnten zudem bislang noch keine Angaben für eine spezifische Bindung des Zytokins an die fraglichen Zielzellen erbracht werden. Ferner lagen noch keine funktionellen Untersuchungen zur IL-11 induzierten Signaltransduktion und zellbiologischen *Downstream-Effekten* in den Zielzellen innerhalb der humanen Kolonmukosa vor. Ziel dieser Arbeit war daher die Identifikation IL-11R α positiver Zellen innerhalb der humanen Kolonmukosa und eine Charakterisierung der durch IL-11 Stimulation induzierten Signaltransduktion, sowie der induzierten zellbiologischen Effekte. Die erarbeiteten Daten sollen eine genauere Definition der molekularen Effektormechanismen von IL-11 bei den klinischen Studien bei Patienten mit mäßig aktivem Morbus Crohn ermöglichen.

V.1 IL-11R α Expression in der humanen Kolonmukosa

Durch die Möglichkeit der Nutzung des neugenerierten, monoklonalen Antikörpers E24.2 gegen den IL-11R α , der uns durch eine Kollaboration mit dem Institut für Biochemie des Universitätsklinikums Aachen zur Verfügung gestellt wurde, konnte in dieser Arbeit erstmals die Analyse der Rezeptorexpression in der humanen Kolonmukosa auf Proteinebene durchgeführt werden. Mittels immunhistochemischer Färbungen mit dem monoklonalen anti-IL-11R α -Antikörper E24.2 an Gefrierschnitten von Kolonresektaten von Patienten mit nicht-entzündeter Mukosa konnten wir erstmals die Expression des Rezeptors ausschließlich auf den Epithelzellen der humanen Kolonmukosa lokalisieren (IV.1.1). Andere Zellen aus der Lamina propria zeigten kein positives Signal mit dem E24.2 Antikörper. Durch eine immunhistochemische Epithelzellmarkierung mit dem EP-4 Antikörper gelang eine Validierung des IL-11R α Expressionsmusters. Die Verteilung der EP-4 positiven Zellen in den Krypten der Lamina Propria entsprach dem Muster der IL-11R α Färbung. Bisher konnte lediglich die IL-11R α Expression auf mRNA-Ebene für primäre Gewebe aus dem murinen Intestinaltrakt gezeigt werden [47,75]. Immunhistochemische Analysen demonstrierten eine IL-11R α Expression in den Epithelzellen von primären Ovarial- und Brusttumoren [97,98]. Campbell et al. konnten kürzlich eine starke Expression des IL-11R α in den Epithelzellschichten von malignen sowie eine deutlich schwächere auf benignen primären Prostatakarzinomen zeigen [99]. Sie postulierten eine mögliche Hochregulation der α -Kette des Rezeptors während der malignen Transformation von Prostataepithelzellen und eine Ausdehnung von Rezeptor-positiven Zellen im Prostataepithel während dieses Prozesses.

Mit den in der Immunhistochemie generierten Daten war erstmals eine Identifikation der Zielzellen einer IL-11-Aktion im humanen Kolon möglich. Demnach sind Kolonepithelzellen direkte Interaktionspartner für das Zytokin und dürften für mögliche IL-11-induzierte immunmodulatorische oder zytoprotektive Effekte innerhalb der humanen Kolonmukosa verantwortlich sein.

Diese Ergebnisse fokussierten unser Interesse auf die Expression des IL-11R α in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 als Model für intestinale Epithelzellen. Auch hier konnten wir mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers E24.2 eine IL-11R α

Expression detektieren (IV.1.2). Für humane Karzinomzelllinien aus Prostata-epithel, Ovarial- und Brustgewebe konnte ebenfalls eine IL-11R α Expression immunhistochemisch gezeigt werden [97-99]. Für Karzinomzelllinien aus dem humanen Intestinaltrakt lagen bisher noch keine Daten vor.

Somit stand eine Kolonepithelzelllinie zur Verfügung, um parallel zu den Untersuchungen an isolierten primären humanen Kolonepithelzellen (CEC) weitere Experimente zur funktionellen IL-11R α Expression durchzuführen.

V.2 IL-11R α Expression in humanen Kolonepithelzellen

V.2.1 IL-11R α Expression auf Transkriptionsebene

Die Ergebnisse aus den immunhistochemischen Untersuchungen veranlassten uns, die IL-11R α mRNA Expression in Kolonepithelzellen detailliert zu untersuchen. Voruntersuchungen zur Reinheit der isolierten Epithelzellpopulation aus Kolonresektaten gewährleisteten eine spezifische Amplifikation der aus Epithelzellen gewonnenen mRNA mittels RT-PCR. Diese Versuche zeigten einen Reinheitsgrad von über 98% (IV.1.3.1) und keine detektierbare Kontamination mit Lamina propria-Zellen (IV.1.3.2). Die durchflusszytometrische DNA-Analyse verdeutlichte einen geringen Prozentsatz an apoptotischen Zellen, induziert durch den Verlust des Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontaktes der hochgradig verankerungsabhängigen Primärzellen des Kolonepithels (IV.1.3.3).

Durch die RT-PCR mit IL-11R α mRNA-spezifischen Oligonukleotid-Primern konnte eine konstitutive IL-11R α Transkription in HT-29-Zellen und isolierten CEC nachgewiesen werden (IV.1.4.1). Der Verdau des erhaltenen Amplifikats mit dem Restriktionsenzym *Pae* III verdeutlichte die Spezifität der cDNA Amplifikation. Eine parallel durchgeführte Amplifikation des *Housekeeping-Gens* G3PDH als interne Kontrolle ermöglichte eine semiquantitative Analyse des Expressionsunterschiedes in den beiden Ansätzen. Es zeigte sich kein Unterschied in der Transkriptionseffizienz zwischen Zelllinie und primären Kolonepithelzellen. Durch einen Northern Blot ließen sich diese Ergebnisse validieren (IV.1.4.2). Das detektierte Transkript von 1,8 kb entspricht der in der Literatur beschriebenen Größe [100].

Bisher konnte lediglich für murines Primärgewebe aus dem Intestinaltrakt und murine Zelllinien eine konstitutive IL-11R α mRNA Expression nachgewiesen werden [71,75]. Für humane primäre Epithelzellen aus anderen Organen liegen allerdings Daten vor, die eine IL-11R α Transkription beschreiben. So konnte z.B. für Epithelzellen aus der Prostata, dem Ovarium und der Brust und in vasculären Endothelzellen eine mRNA Expression nachgewiesen werden [97-99,101]. Ferner zeigen viele humane Karzinomzelllinien, wie z.B. aus Tumoren der Leber (HELA), des Knochenmarks (K562) oder der Knochen (MG63), eine konstitutive IL-11R α mRNA Expression [47,68,90].

V.2.2 IL-11R α Expression auf Translationsebene

Der Western Blot mit dem monoklonalen IL-11R α E24.2 Antikörper zur Bestimmung der Translation aus zytosolischen Gesamtprotein ergab drei unterschiedliche immunreaktive Banden von 49, 36 und 33 kDa (IV.1.5.1). Die Bande mit dem größten Molekulargewicht entsprach der in der Literatur beschriebenen Größe der α -Kette des Rezeptors [48] und verdeutlichte eine konstitutive IL-11R α Translation in Kolonepithelzellen. Die zwei zusätzlich mit diesen Antikörper detektierten Banden könnten als die beschriebene Isoform des IL-11R α ohne den zytoplasmatischen Anteil des Rezeptors interpretiert werden. Gegenwärtig sind zwei verschiedene Isoformen des humanen IL-11R α beschrieben, die beide in der Zellmembran verankert sind [68,72]. Ein unterschiedlicher N-Glykosylierungsanteil könnte den Unterschied von ca. 3 kDa beim Laufverhalten dieser Isoform erklären. Da beide Isoformen als aktiv beschrieben werden [73], würde ein unterschiedliches Expressionsmuster, wie in den von uns durchgeführten Analysen bei HT-29-Zellen und isolierten CEC zu sehen, keinen Unterschied in der nachgeschalteten IL-11-induzierten Signaltransduktion ergeben.

Immunpräzipitationsversuche mit anschließender Detektion mit einem anderen, polyklonalen anti-IL-11R α Antikörper zeigten ein identisches Bandenmuster bei den untersuchten zytosolischen Gesamtproteinlysaten aus diesen Zellen. Demnach stellen die weiteren Banden der immunreaktiven Detektion mit dem monoklonalen E24.2 Antikörper keine unspezifischen Kreuzreaktionen dar.

V.2.3 IL-11R α Zelloberflächenexpression

Zur Analyse der Zelloberflächenexpression des IL-11R α mussten Vorversuche zur Etablierung eines Färbeprotokolls durchgeführt werden, da für den verwendeten E24.2 Antikörper bis dahin noch keine Daten bezüglich einer Verwendung in der Durchflusszytometrie vorlagen. Die Titration des Antikörpers an HT-29-Zellen zeigte eine Abnahme der Fluoreszenzintensität bei niedrigeren Primärantikörperkonzentrationen und verdeutlichte eine spezifische Detektion der α -Kette des Rezeptors auf der Zelloberfläche (IV.1.5.2.1).

Die durchflusszytometrischen Analysen demonstrierten eine Zelloberflächenexpression des IL-11R α auf nahezu allen markierten Kolonepithelzellen. Die gefärbten HT-29-Zellen waren zu 91% und die isolierten CEC zu 93% positiv für die α -Kette des Rezeptors, im Vergleich zu den entsprechenden Isotypkontrollfärbungen (IV.5.2.2). Der reale Anteil IL-11R α positiver Zellen in den untersuchten Ansätzen dürfte allerdings noch höher liegen, da bei der durchflusszytometrischen Analyse eine gleichmäßige Verschiebung der homogenen Zellpopulation zu höherer Fluoreszenzintensität zu sehen war. Es ist zudem anzunehmen, dass es sich bei den Prozentsatz IL-11R α negativer Zellen, festgelegt durch den jeweiligen Quadranten im Dotplot der Isotypkontrollfärbung, um ein Phänomen der Messungenauigkeit des Durchflusszytometers handelt. Selbst bei relativ homogenen Zellpopulationen, wie Zelllinien, kann mit dieser Nachweismethode praktisch nie eine Antigenexpression in 100% der Zellen nachgewiesen werden.

Durchflusszytometrische Analysen von Blanc et al. mit dem monoklonalen Antikörper E24.2 zeigten vor kurzem eine IL-11R α Proteinexpression auf verschiedenen Zelllinien [90]. Allerdings konnten sie demonstrieren, dass sich die Zelloberflächenexpression des IL-11R α auf eine kleine Anzahl der von ihnen untersuchten Zellen beschränkt. So gelang ihnen unter anderem der durchflusszytometrische Nachweis einer signifikanten IL-11R α Zelloberflächenexpression auf hämatopoetischen Zelllinien, wie z.B. HL60 oder THP-1, sowie auf nicht-hämatopoetischen Zelllinien, wie z.B. HELA, SW 620 oder SK-N-MC. Interessanterweise waren nicht alle von ihnen analysierten Zelllinien positiv für den IL-11R α in der Durchflusszytometrie, für die eine Expression auf mRNA-Ebene bereits gezeigt werden konnte (z.B. K562, SVK14). Sie postulieren eine

mögliche post-transkriptionelle Regulation dieses Rezeptors in diesen Zelllinien. Für eine Aussage bezüglich der Funktionalität des IL-11R α scheint eine Analyse der Expression auf Proteinebene unbedingt erforderlich zu sein.

Die Experimente dieser Arbeit zeigten eine homogene Zelloberflächenexpression des IL-11R α auf nahezu allen Kolonepithelzellen und bestätigten die eingangs durchgeführten immunhistochemischen Färbungen zur Lokalisation der Expression des IL-11R α in der humanen Kolonmukosa.

V.3 Funktionalität der IL-11R α Expression in Kolonepithelzellen

V.3.1 Ko-Expression der signaltransduzierenden Untereinheit gp130

Zum Nachweis der Funktionalität der α -Kette des Rezeptors in Kolonepithelzellen ist die Expressionsanalyse des Signaltransduktors gp130 von Bedeutung, da der IL-11R α keine intrinsische Kinaseaktivität innerhalb seiner zytoplasmatischen Domäne besitzt [53]. Die Interaktion nach Ligandbindung mit dem Glykoprotein gp130, die den Rezeptoren der IL-6-Typ Zytokine als gemeinsame signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit dient, ist die Voraussetzung für die Signaltransduktion von der Plasmamembran zum Zellkern [49,52,76]. Gegenwärtig wird die Stöchiometrie des durch Ligandbindung von IL-11 induzierten funktionellen Rezeptorkomplexes als ein Hexamer, bestehend aus jeweils zwei Molekülen von IL-11, IL-11R α und gp130 beschrieben [77]. Die Expression des transmembranen Übertragungsrezeptors gp130 findet sich ubiquitär auf einer Vielzahl von Zellen [102]. Es gelang uns die Translation und Zelloberflächenexpression dieses Glykoproteins in den untersuchten Kolonepithelzellen nachzuweisen. Im Western Blot zeigte sich eine deutliche höhere Expression in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29, als in den isolierten CEC (IV.6.1). Mit der durchflusszytometrischen Analyse ließen sich diese Ergebnisse bestätigen. 84% der HT-29-Zellen waren im Vergleich zu 80% der isolierten primären Epithelzellen positiv mit einem gp130 Antikörper markiert (IV.6.1). Die

unterschiedlichen Expressionsdichten könnten eine Rolle bei der Sensitivität der IL-11-induzierbaren Signaltransduktion spielen. Allerdings lassen die erhaltenen Daten die Frage offen, welche Relevanz die einzelnen Komponenten in der Intensität der IL-11-Signaltransduktion haben.

Bei den CEC zeigte die durchflusszytometrische Analyse der gp130 Zelloberflächenexpression zwei Populationen mit unterschiedlicher Fluoreszenzintensität. Diese unterschiedliche Expressionsdichte für das Glykoprotein könnte von der Lokalisation der Kolonepithelzellen innerhalb der Krypte abhängig sein. Die Zellen migrieren entlang der Krypten-Lumen-Achse und durchlaufen auf ihrer Wanderung einen Differenzierungsprozess [2]. Durch einen unterschiedlichen Differenzierungsgrad, abhängig von der Lokalisation in der Krypte, könnte die gp130 Zelloberflächenexpression in CEC reguliert werden und somit für das in der durchflusszytometrischen Analyse detektierte Phänomen verantwortlich sein. Zur Klärung dieser Frage sind noch weitere Untersuchungen notwendig.

V.3.2 IL-11-induzierte Jak/STAT Signaltransduktion

Viele Zytokine und Wachstumsfaktoren aktivieren Protein-Tyrosinkinasen-Signalwege, die letztlich zu Änderungen der Genexpression führen. Man nimmt an, dass diese Signalwege eine bedeutende Rolle bei Zell-Proliferation, -Überleben, -Differenzierung und -Aktivierung spielen. Es ist bekannt, dass die Zytokine aus der IL-6-Typ Familie unter anderem durch den Jak/STAT-Signalweg die Übertragung extrazellulärer Signale ins Zellinnere, eine Signalverstärkung und die Vermittlung einer spezifischen Zellantwort induzieren [48,103].

Die Experimente zur IL-11 Signaltransduktion mittels Western Blot verdeutlichten eine dosis- und zeitabhängige Jak1 Phosphorylierung in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 und in den CEC (IV.2.1). Die Aktivierung dieser Kinase durch IL-11 erfolgte sehr rasch, innerhalb von einer Minute und klang nach Erreichen eines Maximums nach ca. 15 min innerhalb einer Stunde wieder auf das basale zytosolische Phosphorylierungsniveau ab.

Die Rekrutierung des Transkriptionsfaktors STAT3 nach einer IL-11-Stimulation in Kolonepithelzellen konnte ebenfalls im Western Blot nachgewiesen werden. Bei diesen Experimenten zeigt sich eine dosis- und zeitabhängige Phosphory-

lierung am Tyrosinrest 705 von STAT3 in Abhängigkeit von der Inkubation der Zellen mit rekombinantem IL-11 (IV.2.2). Der Nachweis einer IL-11-induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 in Kolonepithelzellen konnten mittels einer immunhistochemischen Färbung an HT-29-Zellen validiert werden (IV.2.3).

Die durchgeführten Experimente zur Aktivierung des Jak/STAT Signalweges durch Stimulation mit IL-11 in HT-29-Zellen und den isolierten CEC demonstrierten die Funktionalität der IL-11R α Expression. Unsere Ergebnisse bestätigen bereits bekannte Daten zur IL-11-induzierten Signaltransduktion in anderen Zellen [82,104]. Dahmen et al. zeigten eine ähnlich rasche STAT3-Phosphorylierung nach 3 min und ein Maximum der Aktivierung nach ca. 30 min in der Fibrosarkomzelllinie 2fTGH nach einer Stimulation mit 200 ng/ml IL-11 [52]. Auch sie detektierten eine maximale Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors bei einer Sättigungskonzentration von 200 ng/ml IL-11. Für die Nabelschnurendothelzelllinie HUVEC konnten Mahboubi et al. äquivalente Ergebnisse zur STAT3-Aktivierung von IL-11 demonstrieren [101]. Sie zeigten eine Sättigung der STAT3-Phosphorylierung bei ca. 200 ng/ml IL-11 und eine fast synchron verlaufende, IL-11-induzierte Zeitkinetik, wie in dieser Arbeit für Kolonepithelzellen nachgewiesen werden konnte.

Phosphoryliertes STAT3 nimmt als regulatorischer Faktor bei der IL-11-induzierten Signaltransduktion eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von diversen Zielgenen ein [48,87]. Da ein zytoprotektiver Effekt abhängig von einer Proteinneusynthese ist, könnte aktiviertes STAT3 zu einer transkriptionellen Regulation von zytoprotektiv wirkenden Proteinen in diesen Zellen führen. Eine Interaktion oder auch Verstärkung eines alternativen Signalweges kann ebenfalls als zytoprotektiver Effekt einer IL-11 Stimulation diskutiert werden [48,87]. Ferner spielt der Transkriptionsfaktor eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus, des Zellwachstums und der Apoptose. Eine regulatorische Beeinflussung dieser zellbiologischen Mechanismen zeigte sich bereits in verschiedenen Zellkultur- und Tiermodellen und in klinischen Studien [105] und könnte in Kolonepithelzellen eine Rolle spielen. Für viele transformierte Zellen, bei denen eine Dysregulation der Zellproliferation vorherrscht, konnte eine andauernde Aktivierung von STAT3 und weiteren Mitgliedern aus der STAT-Familie detektiert werden [106,107]. Dabei soll eine unkontrollierte Aktivierung

von STAT3 für die Zellzyklus-Progression verantwortlich sein und die Zelltransformation fördern und auf diese Weise die Zellen vor Apoptose schützen [108].

Neben der Aktivierung dieses Signalweges ist physiologisch auch dessen Abschaltung möglich und wichtig. So wird die Jak/STAT Signaltransduktion durch die Expression von SOCS (*suppressor of cytokine signaling*), SS-1 (*STAT induced STAT inhibitor-1*) oder JAB (*Jak binding protein*) gehemmt [105]. Einige dieser Proteine werden auf Transkriptionsebene durch die aktivierten STAT-Proteine selbst reguliert und können die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren aus der STAT-Familie hemmen. Sie sind beispielsweise auch in der Lage direkt an die Jak-Kinasen zu binden und auf diese Weise die Rezeptor-phosphorylierung und die Aktivierung von STAT-Faktoren zu verhindern. Ferner ist eine kompetitive Hemmung der STAT-Aktivität möglich, indem diese Proteine an STAT-Bindestellen von Rezeptoren oder an STAT-Elemente binden [109]. Die Expression dieser STAT-Inhibitoren wird durch viele Liganden, darunter auch die Zytokine aus der IL-6-Typ Familie, induziert.

Auf diese Weise könnte eine IL-11 Stimulation der Kolonepithelzellen verantwortlich für die Induktion von zytoprotektiven Effekten sein, indem das Zytokin als eine Art klassischer, negativer *feedback loop*, über diese Inhibitoren alternative Signalwege regulatorisch beeinflusst oder sogar hemmt.

V.4 Charakterisierung der IL-11-induzierten Downstream-Effekte in Kolonepithelzellen

Die bisher in dieser Arbeit durchgeführten Versuche lassen eine klare Aussage über eine aktive Rolle der Epithelzellen bei der IL-11-induzierten Signalweiterleitung innerhalb der humanen Kolonmukosa zu. Die beschränkte Expression der Rezeptor- α -Kette ausschließlich auf den Epithelzellen der humanen Kolonmukosa lässt den Schluss zu, dass durch eine IL-11 Stimulation ein möglicher immunmodulatorischer oder zytoprotektiver Effekt direkt in diesen Zellen induziert werden kann. Die Epithelzellen könnten ferner durch eine regulierte Sekretion von Zytokinen biologische Wirkungen in weiteren Zellen der Mukosa induzieren und modulieren. Auf diese Weise könnten die Epithelzellen, entweder direkt oder durch Interaktion mit anderen Zellen des Mukosa assoziierten Immunsystems, die in diversen Tiermodellen gezeigten zytoprotektiven Effekte bei verschiedenen Arten der Schädigung der Kolonmukosa induzieren [45,56,63,74]. Auch eine Reduzierung der Krankheitssymptome, wie bei diversen Entzündungsmodellen im Tiermodell gezeigt [64,65,110], könnte als Folge einer Stimulation mit IL-11 von den Epithelzellen vermittelt werden. So wurde bereits eine direkte Modulation des mukosalen Elektrolyt- und Wassertransports von endogenem IL-11, induziert durch die Epithelzellen des Dick- und Dünndarms, gezeigt [66]. Die dadurch reduzierte Chloridsekretion der Epithelzellen leistet einen Beitrag zur Verminderung der Entzündung der intestinalen Barriere.

Allerdings liegen Daten zu einer Aktivierung bestimmter Enzyme, die den Stoffwechsel, Überlebenssignale, Differenzierung, Proliferation oder die Steuerung der Apoptose kontrollieren, für die Epithelzellen des Intestinaltraktes bisher nicht detailliert vor oder werden kontrovers diskutiert [47]. Die meisten Daten für Epithelzellen stammen aus Tiermodellen oder aus murinen Zellkulturexperimenten. Die Vielzahl der Mechanismen lassen die Frage offen, welche Relevanz die funktionelle Expression des IL-11R α und die IL-11-induzierte Signaltransduktion in den humanen Kolonepithelzellen hat. Wir fokussierten unsere Untersuchungen dabei auf bereits in anderen Zellarten und Geweben beschrie-

bene anti-inflammatorische, proliferationsinduzierende und anti-apoptotische Einflüsse.

V.4.1 Anti-inflammatorische Einflüsse von IL-11

Basierend auf Daten aus aktivierten Makrophagen und T-Zellen könnte für die Epithelzellen des Intestinaltraktes ein ähnlicher IL-11-induzierter, immunmodulatorischer Mechanismus postuliert werden. So konnte für z.B. LPS-stimulierte, aktivierte Makrophagen eine Reduzierung der pro-inflammatorischen Zytokinproduktion (TNF, IL-1 β , IL-12, IFN γ , NO) auf Transkriptionsebene nach einer IL-11-Inkubation gezeigt werden [59,60].

Die Produktion von TNF und IL-1 β stellt eine Schlüsselkomponente bei der Entzündungsreaktion dar. Daher werden Inhibitoren dieser Zytokine als anti-inflammatorische Mediatoren eingestuft [42]. Der anti-inflammatorische Einfluss von IL-11 beruht auf einer erhöhten I κ B-Proteinsynthese in aktivierten Makrophagen und konnte ebenfalls *in vivo* in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden [59-61,111,112]. Der Effekt von IL-11 auf aktivierte T-Zellen konnte durch eine biologische Wirkung in diversen Tiermodellen mit T-Zell-vermittelten Krankheiten beschrieben werden [64,113]. Dabei beeinflusste IL-11 direkt die CD4⁺ T-Zell-Differenzierung zu Th1-Effektorzellen, die in der Lage sind IFN γ zu produzieren oder zu Th2-Effektorzellen, die IL-4 sezernieren können. Die Experimente verdeutlichten eine Reduzierung der IFN γ -Produktion von aktivierten T-Zellen und eine Induktion der IL-4 Produktion in den CD4⁺ T-Zellen.

Diese *in vitro* und *in vivo* gezeigten Effekte von IL-11 empfahlen einen Einsatz zur Therapie von zumindest partiell T-Zell vermittelten chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. dem Morbus Crohn. Da unsere bisherigen Versuche, die Expression des IL-11R α auf den Epithelzellen innerhalb der humanen Kolonmukosa verdeutlichten, müssten in diesen Zielzellen anti-inflammatorische Effekte, induziert durch IL-11, zu detektieren sein. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass intestinale Epithelzellen vor allem den anti-inflammatorisch wirkenden Interleukin-1-Rezeptor Antagonisten (IL-1RA) und geringe Mengen IL-8 synthetisieren [29,31]. IL-8 stellt ein klassisches NF- κ B induziertes Chemokin dar. Daher wurden die Untersuchungen zu möglichen

anti-inflammatorischen Wirkungen von IL-11 über die IL-8 Sekretion in den Zellkulturüberstand von Kolonepithelzellen analysiert. Als pro-inflammatorischen Stimulus für die Induktion von IL-8 in Kolonepithelzellen wählten wir das Zytokin Tumor Nekrose Faktor (TNF), welches bei CED eine wichtige Rolle spielt und als *Readout* für die pro-inflammatorische Induktion die Sekretion von IL-8 in den Überstand. Allerdings zeigten weder eine Ko-Stimulation noch eine Vorstimulation der Zellen mit verschiedenen IL-11 Konzentrationen eine Inhibierung der TNF-induzierten IL-8 Sekretion in den Zellkulturüberstand von Kolonepithelzellen (IV.3.1.1).

Zur Validierung dieser Ergebnisse untersuchten wir den Einfluss von IL-11 auf die I κ B- α Proteinexpression und die Degradierung des Proteins nach einer Inkubation von HT-29-Zellen mit TNF. In der Literatur finden sich Hinweise auf einen regulatorischen Einfluss von IL-11 auf die Neusynthese von I κ B- α Protein in mononukleären Zellen und dadurch eine Inhibierung der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B [61]. Durch diese verminderte Induktion möglicher NF- κ B abhängiger pro-inflammatorischer Zytokine könnte IL-11 anti-inflammatorische Einflüsse in diesen Zellen induzieren. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B liegt im Zytoplasma als inaktiver Komplex aus p50/p65 Heterodimer vor, das mit einer dritten Untereinheit, I κ B, verbunden ist. I κ B, von dem bisher die drei Subtypen I κ B- α , I κ B- β und I κ B- γ bekannt sind, sorgt dafür, dass der inaktive Komplex des Transkriptionsfaktors NF- κ B im Zytoplasma zurück gehalten wird. Durch eine Stimulation, z.B. mit dem prototypischen Aktivator TNF, wird die Phosphorylierung von I κ B induziert, was als Voraussetzung für die anschließende Ubiquitinierung gilt. Diese ist wiederum das Signal für den Abbau von I κ B durch Proteasomen. Nach dem proteolytischen Abbau von I κ B kann der nun aktive NF- κ B Komplex, bestehend aus p50/p65-Untereinheiten, in den Zellkern translozieren und an Promotorstrukturen binden. NF- κ B spielt bei der Induktion und Regulation pro-inflammatorischer Zytokine eine bedeutende Rolle. Pro-inflammatorische Zytokine, induziert durch den NF- κ B Signalweg sind entscheidend an der Entstehung und Persistenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen beteiligt. Daten aus unserer Arbeitsgruppe bewiesen eine Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors in Kolonepithelzellen und intestinalen Ma-

krophagen und geben einen Hinweis auf eine aktive Beteiligung am Entstehungsprozess chronisch entzündlicher Darmerkrankungen [114].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente demonstrierten allerdings keinen Einfluss von IL-11 auf die I κ B- α Proteinsynthese und Inhibierung der TNF-induzierten Degradierung von I κ B- α in Kolonepithelzellen. Die Daten aus unseren Versuchen bezüglich einer möglichen anti-inflammatorischen Wirkung von IL-11 auf Kolonepithelzellen zeigten eine Diskrepanz zu den Angaben aus *in vivo* und *in vitro* Experimenten mit aktivierten Makrophagen und T-Zellen. In Kolonepithelzellen zeigte eine Inkubation mit IL-11 keine Beeinflussung des NF- κ B vermittelten Entzündungsprozess. Unsere *in vitro* Daten unterstützen somit nicht die *in vivo* gezeigten anti-inflammatorischen Effekte von IL-11 der Zellen des Gastrointestinaltraktes in Tiermodellen mit einer chronischen Entzündung des Darmes, wie z.B. im HLA B27 oder TNBS-Kolits Modell bei Ratten [64,110]. Bei alternativen Entzündungsmodellen, wie der Psoriasis oder der Listeria-induzierten Endotoxämie in Ratten wird der anti-inflammatorische bzw. protektive Effekt einer IL-11 Inkubation gezeigt, allerdings auf die Zielzellen der IL-11 Aktion und den induzierten Mechanismus nicht genauer eingegangen [60,112,115]. Die anti-inflammatorische Wirkung wurde für die Makrophagen postuliert.

In der Literatur finden sich Anhaltspunkte, die unsere These einer Nichtbeteiligung von Kolonepithelzellen bei der IL-11-induzierten anti-inflammatorischen Wirkung unterstützen. Mahboubi et al. konnten kürzlich eine funktionelle Expression der α -Kette des Rezeptors auf primären vaskulären Endothelzellen sowie in der Endothelzelllinie HUVEC nachweisen [101]. Sie konnten ferner zeigen, dass IL-11 in diesen Zellen keine anti-inflammatorischen Effekte über den NF- κ B vermittelten Signalweg induziert. In ihren Versuchen demonstrierten sie *in vitro* eine zytoprotektive Wirkung von IL-11 auf die vaskulären Endothelzellen durch Inhibierung einer Zell-Lyse von allospezifischen Klasse I MHC beschränkten zytotoxischen T-Lymphozyten. Die gezeigte partielle Resistenz der HUVEC-Zellen gegenüber zytotoxischen T-Zellen könnte eine bedeutende Rolle bei der Heilung und Wiederherstellung zerstörten vaskulären Endothels spielen.

Unsere Daten unterstützen die in vaskulären Endothelzellen gezeigte Nichtbeteiligung von IL-11 *in vitro* bei der Induktion von anti-inflammatorischen Effekten. Die in verschiedenen Tiermodellen gezeigten zytoprotektiven Effekte von IL-11 können im humanen System nicht durch eine immunmodulatorische Wirkung der Epithelzellen des Kolons vermittelt werden. Viele molekulare Komponenten wurden mit der Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges in Zusammenhang gebracht. Die diversen Mechanismen aller gp130 signaltransduzierender Zytokine stellt ein weites Spektrum an biologischen Wirkungen dar und ist gewiss von der Zellart abhängig [116]. Um ein genaueres Bild über diese Vorgänge zu erhalten, wurden alternative biologische Wirkungen, wie ein proliferationsinduzierender oder anti-apoptotischer Einfluss von IL-11 in Kolonepithelzellen analysiert.

V.4.2 Proliferationsinduzierende Einflüsse von IL-11

Ein weiterer zytoprotektiver *Downstream-Effekt* könnte eine direkte proliferationsinduzierende Wirkung von IL-11 auf die Kolonepithelzellen sein. Durch diese Wirkung könnte eine Beeinflussung der Zellzyklusphasen und eine daraus resultierende Veränderung des Proliferationsverhalten der Epithelzellen zu einer gesteigerten Heilung oder Wiederherstellung der intestinalen Barriere nach einer Schädigung oder Irritation führen [117]. Die Wirkungen bezüglich einer Regulation des Zellzyklus und des Proliferationsverhaltens von IL-11 sind zellspezifisch und werden in der Literatur kontrovers beschrieben. So findet sich einerseits eine Hemmung des Proliferationsverhaltens in nicht oder gering transformierten Ratenzelllinien (IEC-6) des Gastrointestinaltraktes oder keine Beeinträchtigung in transformierten Karzinomzelllinien [74,94]. Die Experimente an der intestinalen Rattenepithelzelllinie zeigten, dass durch eine IL-11 Stimulation eine Verzögerung des Eintritts in die S-Phase des Zellzyklus vermittelt wird und daraus eine reduzierte Zellproliferation resultiert. Durch die Progression des Zellzyklus in der G1-Phase könnte IL-11 durch eine direkte Interaktion mit den Kolonepithelzellen eine zytoprotektive Wirkung vermitteln. Peterson et al. postulieren die vorübergehende Unterbrechung des Zellzyklus als einen möglichen Grund für die protektive Wirkung dieses Zytokins bei verschiedenen

Schädigungen und Irritationen der Kolonmukosa nach einer Chemotherapie oder einer Bestrahlung des Darms [74].

Um mögliche Effekte in humanen Kolonepithelzellen zu untersuchen, analysierten wir das Proliferationsverhalten von HT-29-Zellen in Abhängigkeit von der IL-11-Inkubation. Die Ergebnisse des MTS-Tests zeigten, dass eine 48 h Stimulation der Zellen mit IL-11 keinen eindeutigen Effekt auf die Zellviabilität hatte (IV.3.2.1). Die durchflusszytometrische DNA-Analyse und statistische Zellzyklus-Auswertung zeigten keine Änderung des prozentualen S-Phasen Anteils von HT-29-Zellen nach einer IL-11 Stimulation im subkonfluenten und konfluenten Wachstumszustand. Somit konnte für diese Zellen kein Einfluss von IL-11 auf die Progression des Zellzyklus nachgewiesen werden. In der exponentiellen Phase des Zellwachstums lag der S-Phasen Anteil bei ca. 31%. Durch die Kontaktinhibierung der adhärent wachsenden HT-29-Zellen im konfluenten Plateauwachstumszustand zeigten diese einen signifikanten Rückgang des S-Phasenanteils auf nur noch ca. 19% (IV.3.2.2). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bestätigten die von anderen Arbeitsgruppen für diverse Karzinomzelllinien gezeigte fehlende Beeinflussung bezüglich des Proliferationsverhaltens nach einer Stimulation mit IL-11. Aus methodischen Gründen konnte eine Analyse an den nicht mehr proliferierenden, isolierten CEC nicht durchgeführt werden.

V.4.3 Anti-apoptotische Einflüsse von IL-11

Da eine anti-inflammatorische oder proliferationsinduzierende Wirkung von IL-11 auf Kolonepithelzellen trotz einer funktionellen Signaltransduktion über den Jak/STAT Signalweg nicht gezeigt werden konnte, dienten die weiteren Experimente der Analyse eines möglichen anti-apoptotischen Einflusses. In der Literatur finden sich Daten, die einen zytoprotektiven Effekt von IL-11 durch Inhibition von intrazellulären apoptotischen Vorgängen postulieren [63,118-121]. So konnten z.B. Orazi et al. einen ausgeprägten stimulatorischen Effekt von IL-11 auf die Wiederherstellung der durch Bestrahlung oder Behandlung mit zytotoxischen Chemikalien zerstörten Dünndarmmukosa im Mausmodell zeigen [63]. Ihre Ergebnisse demonstrierten eine Reduzierung der Apoptose in den Krypten,

die durch den Verlust der Zellverankerung induziert wurde und eine Zunahme des Proliferationsverhaltens der Epithelzellen nach einer IL-11 Stimulation. Diese Effekte führten zu einer erhöhten Überlebensrate von IL-11 behandelten Mäusen, die eine zerstörte intestinale Epithelschicht nach einer Inkubation mit zytotoxischen Substanzen aufwiesen. Die Autoren konnten mit diesen Versuchen eine anti-apoptotische Wirkung von IL-11 *in vivo* nachweisen und postulierten einen zytoprotektiven Effekt dieses Zytokins. Allerdings ließen ihre Untersuchungen Aussagen über mögliche Mechanismen der Apoptoseinhibierung von IL-11 in den Kolonepithelzellen des murinen Dünndarms offen.

Scordi et al. demonstrierten eine Hochregulation von IL-11 mRNA in den epidermalen Keratinozyten von Mäusen nach einer UVB-Bestrahlung [119]. Sie konnten ferner nachweisen, dass eine IL-11-Injektion in die Mausepidermis eine Inhibierung der durch eine Bestrahlung induzierten Apoptose zur Folge hat. Sie postulierten somit neben einer verbesserten Epithelzellhomöostase, auch eine Beteiligung dieses Zytokins bei der Apoptoseinhibierung in der Epidermis von Mäusen. Allerdings konnten auch sie keine Angaben zu möglichen Mechanismen der anti-apoptotischen Signalvermittlung in ihrem Tiermodell geben.

Die biologischen Wirkungen einer STAT3 Aktivierung sind noch nicht vollends verstanden. In der Literatur belegen Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten, aus Tiermodellen und klinischen Studien eine bedeutende Rolle von STAT3 bei der Transkription diverser Gene, die verantwortlich sind für die Hemmung der apoptotischen Signaltransduktion [105,106,122]. So konnte z.B. gezeigt werden, dass eine Überexpression von aktiviertem STAT3 zu einer erhöhten Apoptoseresistenz und letztendlich zu Förderung eines unkontrollierten Zellwachstums führt [108].

V.4.3.1 Bcl-2 Proteinexpression

Die Mitglieder aus der STAT-Transkriptionsfaktor-Familie wurden vor kurzem als direkte Regulatoren der Bcl-2-Genfamilie, die als zentrale Proteine der Apoptoseregulation fungieren, beschrieben [95,122]. Die Expression dieser anti-apoptotischen Proteine wird durch diverse Stimulanzen, unter anderem Zytokine aus der IL-6-Typ-Familie hochreguliert und führt dadurch zur Induktion von Überlebenssignalen in den Zielzellen [95]. Verschiedene Mitglieder der Bcl-2

Familie werden in den Epithelzellen der Krypten des Kolons exprimiert [17,18]. Sie spielen in der Regulierung der mitochondrial ablaufenden Apoptoseprozesse eine bedeutende Rolle. Das pro-apoptotische Bax funktioniert dabei als Auslöser der Apoptose, während sein natürlicher Antagonist, das anti-apoptotische Protein Bcl-2, als Suppressor des programmierten Zelltodes gilt [126].

Wie die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente demonstrieren, zeigte die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 weder eine konstitutive Bcl-2 Protein Expression noch eine Induktion dieses anti-Apoptoseproteins durch eine Inkubation mit IL-11 (IV.3.3.1). Die Versuche an kultivierten CEC verdeutlichten eine konstitutive Proteinexpression von Bcl-2 Protein in diesen Zellen. Die Stimulation mit IL-11 induzierte eine Hochregulation der Bcl-2 Proteinmenge in den Primärzellen.

Die unterschiedliche Expression in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 und den CEC könnte im unterschiedlichen Differenzierungsgrad der Zellen und v. a. in der Transformation der Zelllinie begründet sein.

Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass eine mögliche anti-apoptotische Wirkung von IL-11 durch eine Hochregulierung des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 in CEC induziert werden könnte. Bei einer Verschiebung des relativen Verhältnisses der Proteine aus dieser Familie auf die Seite des Apoptose-Suppressors Bcl-2, könnten die Zellen in der Lage sein, die Cytochrom-c Freisetzung aus den Mitochondrien zu verhindern und damit die Apoptoseinduktion zu unterbinden.

Es wird postuliert, dass Bcl-2 *upstream* zur Caspasenaktivierung agiert und seine anti-apoptotische Wirkung durch Suppression der Caspasenaktivität entfaltet [127,128] oder Apoptose unterbindet, indem es die Depolarisation des mitochondrialen Transmembranpotenzials verhindert. Man geht davon aus, dass Bcl-2 die Permeabilitäts-Transitions-pore blockiert und somit die Freisetzung von Cytochrom-c ins Zytoplasma inhibiert [17,129]. Obwohl der genaue Mechanismus der Wirkungsweise dieser Moleküle noch nicht geklärt ist, wird angenommen, dass sie miteinander Dimere bilden können. Das relative Verhältnis dieser Dimere zueinander bestimmt das Gleichgewicht zwischen Überleben und Apoptose.

V.4.3.2 Phosphorylierung der Proteinkinase B / Akt

Andere Experimente demonstrierten einen anti-apoptotischen Einfluss von Zytokinen aus der IL-6-Familie über eine erhöhte STAT3 Phosphorylierung oder Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI 3-Kinase) und der Proteinkinase B / Akt [123,124]. Für IL-11 wurde z.B. in Mauspräadipozyten (3T3-Zellen) eine erhöhte Phosphorylierung der PI3-Kinase festgestellt [125]. Unsere weiteren Experimente fokussierten sich deshalb auf mögliche induzierte anti-apoptotische Signalwege oder die Aktivierung weiterer Transduktionselemente bezüglich einer anti-apoptotischen Wirkung durch den PI-3-Kinase / Akt-Signalweg.

Die PI 3-Kinase ist ein Dimer, bestehend aus einer katalytischen Untereinheit von 110 kDa und einer regulatorischen Untereinheit von 85 kDa [130]. Letztere besitzt zwei SH2-Domänen, mit denen die Kinase im Rahmen einer Signalübertragung spezifische Wechselwirkungen mit anderen Signalproteinen eingehen kann. Die PI 3-Kinase phosphoryliert *in vitro* verschiedene Phosphatidylinositol-Derivate, wie z.B. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI-4,-5-P₂) oder Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PI-3,-4,-5-P₃). Nach Stimulation mit einem Wachstumsfaktor oder Zytokin kommt es zu einem raschen Anstieg der PI-3,-4,-5-P₃-Konzentration und einer nachgeschalteten Anlagerung der PI 3-Kinase über ihre *Pleckstrin Homology*-(PH) Domäne an die Zellmembran. Dadurch können diverse signalvermittelnde Proteine über ihre PH-Domäne an der Zellmembran rekrutiert werden, von denen die Regulierung der Proteinkinase B / Akt die wichtigste zu sein scheint. Wir fokussierten unsere Analysen auf die *downstream* liegende Proteinkinase Akt. Diese ist als zentrales Protein in vielen Signalweiterleitungen beteiligt und vermittelt anschließend als eine Art Schlüsselenzym eine Vielzahl von Überlebenssignalen innerhalb der jeweiligen Zielzellen (zusammengefasst in [131]). Die Phosphorylierung von Akt erfolgt über eine 3-Phosphatid-abhängige Kinase (PDK1/2) am Threoninrest 308 in der Kinase-Domäne und am Serinrest 473 am C-Terminus [132]. Die Aktivierung am Serinrest 473 wird als entscheidend für die Regulation und Aufrechterhaltung der Aktivität beschrieben [133]. Der PI 3-Kinase/Akt induzierte Signalweg und die Akt-Substrate sind in Abbildung V.1 zusammengefasst.

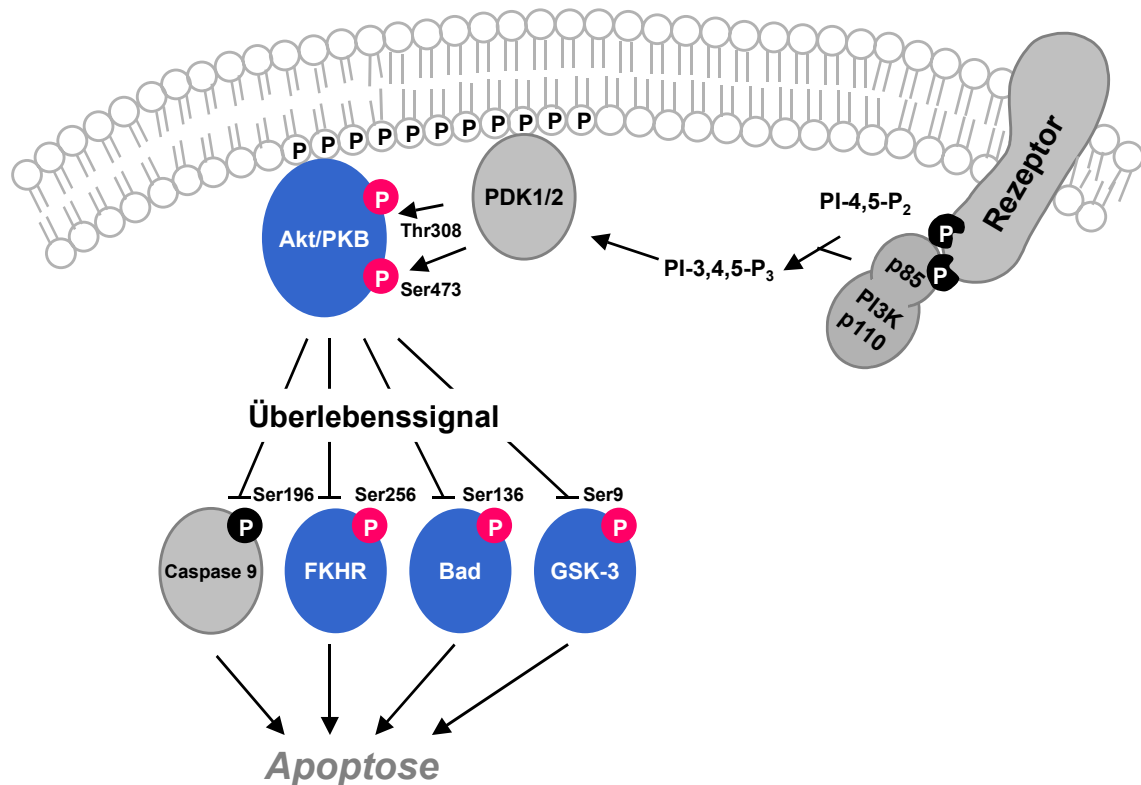


Abbildung V.1: Schematische Darstellung des PI 3-Kinase und Akt Signalweges.

Die gesteigerte Aktivität von Akt führt zur Induktion verschiedener Überlebenssignale in der Zelle. Durch die Phosphorylierung von Caspase-9 und des Proteins „Bad“ werden diese beiden pro-apoptotischen Moleküle inhibiert und können so die Apoptosesignalkaskade nicht mehr aktivieren [134]. Durch die Phosphorylierung des *Forkhead* Transkriptionsfaktors (FKHR) wird dieser ebenfalls inhibiert und verbleibt unaktiviert im Zytoplasma. Die Glykogensynthase Kinase-3 (GSK-3) stellt ein weiteres Akt-Substrat dar und ist in der Lage durch eine Phosphorylierung am Serinrest 9 anti-apoptotische Effekte in verschiedenen Zellarten zu vermitteln [131].

Wir haben den Einfluss einer IL-11 Stimulation auf die Phosphorylierung von Akt in Kolonepithelzellen analysiert. Unsere Versuche zeigten erstmalig eine Rekrutierung von Akt in den untersuchten Zellen infolge einer Stimulation mit IL-11. Sowohl in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29, als auch in den CEC konnten wir eine dosisabhängige Phosphorylierung am Serinrest 473 von Akt nachweisen. Die Aktivierung der als zentrales Molekül bei der Übertragung von Überlebenssignalen beschriebenen Proteinkinase könnte eine anti-apoptotische Wirkung innerhalb der Kolonepithelzellen vermitteln. So könnte wie in diversen

Tiermodellen gezeigt werden konnte, ein zytoprotektiver Einfluss durch eine anti-apoptotische Signaltransduktion von IL-11 diskutiert werden.

Abreu et al. zeigten vor kurzem einen dualen Effekt von PI 3-Kinase-Agonisten auf die intestinale Entzündung [135]. Ihre Versuche verdeutlichten einen protektiven Einfluss von Wachstumsfaktoren bei der Fas-induzierten Apoptose. Ferner demonstrierten sie, dass die Signaltransduktion über die PI 3-kinase einen hemmenden Einfluss auf die Chloridsekretion der Epithelzellen im Kolon vermittelt und somit die Dysregulation der Barrierefunktion während der intestinalen Entzündung reduziert.

Auch der bei der Ätiologie von CED postulierte Defekt der strukturellen Integrität des intestinalen Epithels, könnte eine anti-apoptotischen Wirkung von IL-11 auf die Epithelzellen eine Rolle spielen. Dies könnte ein Grund für einen zytoprotektiven Effekt einer Stimulation mit IL-11 sein, wie er momentan in klinischen Studien bei Patienten mit mäßig aktivem Morbus Crohn in unserer Klinik untersucht wird.

Allerdings widersprechen unsere Daten den prä-klinischen *in vivo* und *in vitro* Studien. Diese postulieren immunmodulatorische Eigenschaften von IL-11 durch eine Inhibierung pro-inflammatorischer Mediatoren in aktivierten Makrophagen und T-Zellen. Unsere Ergebnisse können als eine Alternative zu den bisher postulierten zellbiologischen Wirkungen von IL-11 im Kolon diskutiert werden. Ein anti-apoptotischer Effekt von IL-11 dürfte während eines aktiven Schubes beim Morbus Crohn, der mit einer verstärkten Entzündungsreaktion verbunden ist, keine so bedeutende Rolle spielen. Diese Wirkung dürfte eher bei der Wiederherstellung der defekten intestinalen Barriere nach der Entzündung eine Rolle spielen. Unsere Ergebnisse empfehlen daher eher einen Einsatz von IL-11 bei diversen Schädigungen oder Irritationen der Kolonmukosa, wie z.B. nach einer Bestrahlung oder einer Chemotherapie. Die von Orazi et al. und Scordi et al. gezeigten Daten im Tiermodell unterstützen dabei diese These.

V.4.3.3 Inhibierung der Caspase-9 Aktivität

CEC unterliegen nach der Ablösung von der Matrix einer massiven Apoptoseinduktion, der sogenannten „Anoikis“, die unter Beteiligung der Caspasenkaskade verläuft [23]. Da unsere Daten eine Aktivierung der Proteinkinase Akt durch eine IL-11 Stimulation in Kolonepithelzellen verdeutlichten, wurden in den folgenden Experimenten die nachgeschalteten Substrate der Proteinkinase analysiert. Unter den bis heute bekannten Akt-Substraten dürfte hinsichtlich einer anti-apoptotischen Signalweiterleitung die durch eine Phosphorylierung am Serinrest 196 eingeleitete Inhibierung der Caspase-9 eine bedeutende Rolle spielen. Daten aus unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass unter anderem eine Aktivierung der Caspase-9 innerhalb von 30 min in den isolierten CEC induziert wird, wenn diese nach ihrer Isolation in Suspension gehalten werden [92]. Wir haben deshalb die Aktivierung dieser bei der Induktion der mitochondrialen Apoptose wichtige Caspase in Abhängigkeit von der IL-11 Stimulation analysiert.

Die Ergebnisse aus den Versuchen zeigten eine Reduzierung der Caspase-9 Aktivität nach einer 30-minütigen Vorinkubation der Zellen mit IL-11 (IV.3.3.3). Diese Ergebnisse demonstrierten erstmalig eine direkte Beeinflussung der apoptotischen Signalkaskade in Kolonepithelzellen durch IL-11 über die Caspase-9. Aktivierte Caspase-9 wiederum kann andere Caspasen, z.B. die Caspase-3 und -6 aktivieren und auf diese Weise die apoptotische Signalweiterleitung verstärken. Die von uns gezeigte Hemmung der Caspase-9 durch IL-11 könnte eine Abschwächung der durch Verlust der Zellmatrix induzierten Apoptose in CEC vermitteln. Wir haben deshalb als weiteren funktionellen Nachweis die Apoptoserate von in Suspension gehalten, frisch isolierten CEC in Abhängigkeit einer IL-11 Inkubation untersucht. Die Versuchsreihe zeigte eine Reduzierung des Anteils an apoptotischen Zellen nach einer IL-11-Vorinkubation um ca. 8% (IV.3.3.4).

Es kann vermutet werden, dass der relativ gering ausfallende Unterschied der beiden Ansätze, durch den relativ starken Trigger der Anoikis bedingt wird. Außerdem verläuft die Induktion dieser speziellen Form der Apoptose in CEC nicht ausschließlich über den mitochondrialen Weg der Caspasenaktivierung [92]. Weitere apoptotische Signalinduktionen und Signalverstärkungen in der Zelle könnten den durch eine IL-11 Stimulation induzierten anti-apoptotischen Effekt reduzieren bzw. eliminieren.

V.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass durch eine funktionelle Expression des IL-11R α auf den Epithelzellen des humanen Kolons eine anti-apoptotische Wirkung des spezifischen Liganden IL-11 in diesen Zellen vermittelt werden kann. Dabei ist es uns gelungen, die Rekrutierung von Akt, eines Schlüsselenzyms bei der Vermittlung von Zellüberlebenssignalen, durch eine IL-11 Stimulation in Kolonepithelzellen nachzuweisen. Wir fokussierten unsere Analysen in dieser Arbeit nur auf ein Substrat von Akt, die Caspase-9. Allerdings können durch eine Aktivierung von Akt weitere alternative Substrate dieser Proteinkinase phosphoryliert und dadurch alternative zellbiologische Wirkungen induziert werden. Auf diese Weise ergeben sich eine Reihe von Folgeuntersuchungen, die die molekularen Mechanismen einer IL-11 vermittelten Aktivierung downstream zur Akt-Phosphorylierung analysieren sollen. Untersuchungen bezüglich einer Inhibierung des pro-apoptotischen Proteins Bad, des *Forkhead* Transkriptionsfaktors (FKHR) und der Glykogensynthase Kinase-3 (GSK-3) durch Phosphorylierung an den jeweiligen Serinresten könnten das Verständnis der intrazellulären Umsetzung eines anti-apoptotischen Triggers durch IL-11 im Allgemeinen und von Anoikis im Speziellen erweitern. Eine Analyse möglicher nachgeschalteter Signalkaskaden, wie z.B. die Inhibierung von aktivierten Caspasen könnte neue Erkenntnisse über die Rolle von IL-11 bei der intestinalen Homöostase und die Wirkung bei der Heilung von Epithelschäden im Rahmen entzündlicher Darmerkrankungen bringen.

Die Tatsache, dass eine (Vor-) Stimulation der frisch isolierten primären humanen Kolonepithelzellen (CEC) eine Reduzierung der Caspase-9 Aktivität und

eine Verminderung der apoptotischen Zellen in Suspension induzierte, lässt vermuten, dass ein Zusatz von IL-11 bei der Kultur von CEC eine Verbesserung der Überlebensrate in der Primärkultur mit sich bringen könnte. Untersuchungen bezüglich der Viabilität von CEC in Kultur mit einer IL-11 Inkubation könnten neue Erkenntnisse für die Langzeitkultur dieser Zellen bringen. Experimente bezüglich der Gesamtzahl der adhärenenten CEC, deren Apoptoserate, deren Proliferationsrate und deren metabolische Aktivität könnten durchgeführt werden und mit den bisherigen etablierten Standardkonditionen der primären Zellkultur verglichen werden. Somit könnte eine mögliche anti-apoptotische Wirkung von IL-11 in diesen Zellen analysiert werden, die vermutlich *in-vivo* Einfluss auf die biologische Aktivität und den Lebenszyklus der Epithelzellen in der humanen Kolonmukosa zeigt.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Durch die Möglichkeit der Nutzung des neugenerierten, monoklonalen Antikörpers E24.2 gegen den IL-11R α konnten wir immunhistochemisch an Gefrierschnitten aus Kolonresektaten von Patienten mit nichtentzündeter Mukosa zeigen, dass sich die Expression auf die Epithelzellen des Kolons beschränkt. Damit waren die Voraussetzungen für eine funktionelle Charakterisierung der IL-11R α Expression in Kolonepithelzellen geschaffen. Durch die Aufklärung der diesen Prozessen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen erwarteten wir Erkenntnisse über die physiologischen Zusammenhänge einer IL-11 Stimulation in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu erlangen. Die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 und isolierte primäre humane Kolonepithelzellen (CEC) exprimierten auf Transkriptions- und Translationsebene die α -Kette des Rezeptors für den spezifischen Liganden IL-11 und das Glykoprotein gp130, die signaltransduzierende Untereinheit des hexameren Rezeptorkomplexes. Ferner konnten wir nachweisen, dass eine Stimulation der Kolonepithelzellen eine dosis- und zeitabhängige Phosphorylierung des Jak/STAT-Signalweges in diesen Zellen induzierte und lieferten somit erstmalig den Beweis für eine funktionelle Expression des IL-11R α auf humanen Kolonepithelzellen.

Als weitere Fragestellung untersuchten wir, welche biologische Aktivität IL-11 in den Zielzellen hat. Wir fokussierten unsere Analysen dabei auf bereits in anderen Zellarten und Geweben beschriebene anti-inflammatorische, proliferationsinduzierende und anti-apoptotische Einflüsse.

Eine Inkubation der humanen Kolonepithelzellen mit IL-11 bewirkte keine anti-inflammatorische Wirkung über den NF- κ B vermittelten Signalweg. Unser Daten widersprechen somit der bisher postulierten These einer immunmodulatorischen Aktivität dieses Zytokins im Gastrointestinaltrakt durch eine gesteigerte I κ B Proteinexpression. Zudem zeigte eine IL-11 Stimulation keine Beeinflussung der Zellzyklusphasen und keine proliferationsinduzierenden Effekte in den untersuchten Zellen. Die Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen an IL-11 induzierte eine Hochregulation der Bcl-2 Proteinsynthese lediglich in den Primärzellen. Ferner konnten wir durch Stimulation mit IL-11 eine dosisabhängige Phosphorylierung von Akt am Serinrest 473 nachweisen. Eine Aktivierung von

Akt, *downstream* zur der Lipidkinase Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI 3-Kinase), inhibiert unter anderem die Aktivierung der Caspase-9, ein Schlüsselprozess bei der mitochondrialen Apoptoseinduktion. In einem Modell, indem die Auslösung der Apoptose durch Suspension der frisch isolierten CEC in Medium erfolgte, konnten wir eine Reduzierung der Caspase-9 Aktivität innerhalb von 60 min nachweisen. Zudem gelang uns durch eine Vorstimulation der Zellen mit IL-11 eine Reduzierung der Apoptoserate in den durch Verlust der Zellverankerung apoptotischen CEC. Wir konnten somit erstmals die Verbindung einer IL-11 Stimulation zu einer Inhibierung der Signalketten der Caspasenkaskade und eine anti-apoptotische Wirkung dieses Zytokins in Kolonepithelzellen zeigen. In Abbildung VI.1 sind die Ergebnisse zur Untersuchung der funktionellen Expression des IL-11R α auf humanen Kolonepithelzellen schematisch dargestellt.

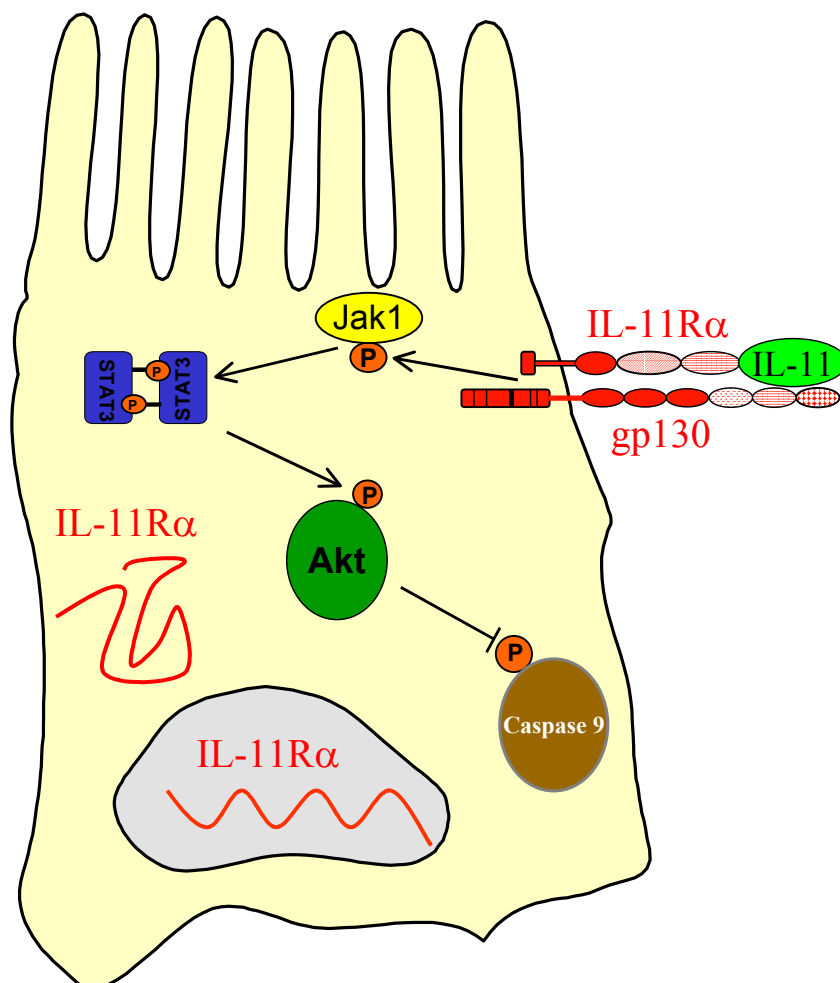


Abbildung VI.1: Übersicht über die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zur funktionellen Expression des IL-11R α in CEC.

Wir konnten durch die Aufklärung der diesen Prozessen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen detaillierte Erkenntnisse über die physiologischen und biologischen Zusammenhänge der IL-11 Stimulation in der Kolonmukosa beitragen. Künftige weitere Analysen der IL-11R α Expression in Kolonepithelzellen aus entzündeter Mukosa werden noch zu einem besseren Verständnis der biologischen Aktivität der IL-11-induzierten Signaltransduktion führen und gezielte Eingriffe in das anti-apoptotische Wirkungsspektrum von IL-11 bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ermöglichen.

VII LITERATURVERZEICHNIS

1. Feldman, M. and Boland, C. R. *In: Gastroenterology and Hepatology; The Comprehensive Visual Reference. Volume 2, Colon, Rectum and Anus: 16, 1992.*
2. Booth, C. and Potten, C. S. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest, 105: 1493-1499, 2000.*
3. Caspary, W. F. and Strater, J. *Darmkrankheiten; Klinik, Diagnostik und Therapie. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1999.*
4. Goke, M. and Podolsky, D. K. Regulation of the mucosal epithelial barrier. *Baillieres Clin Gastroenterol, 10: 393-405, 1996.*
5. Yamada, T. 1. *Textbook of Gastroenterology. J B Lippincott Company, Philadelphia, 2nd edition.: 1995.*
6. Tidball, C. S. The nature of the intestinal epithelial barrier. *Am J Dig Dis, 16: 745-767, 1971.*
7. Vidrich, A., Ravindranath, R., Farsi, K., and Targan, S. A method for the rapid establishment of normal adult mammalian colonic epithelial cell cultures. *In Vitro Cell Dev Biol, 24: 188-194, 1988.*
8. Hata, Y., Ota, S., Nagata, T., Uehara, Y., Terano, A., and Sugimoto, T. Primary colonic epithelial cell culture of the rabbit producing prostaglandins. *Prostaglandins, 45: 129-141, 1993.*
9. Kinugasa, T., Kuroki, M., Yamanaka, T., Matsuo, Y., Oikawa, S., Nakazato, H., and Matsuoka, Y. Non-proteolytic release of carcinoembryonic antigen from normal human colonic epithelial cells cultured in collagen gel. *Int J Cancer, 58: 102-107, 1994.*
10. Potten, C. S. and Allen, T. D. Ultrastructure of cell loss in intestinal mucosa. *J Ultrastruct Res, 60: 272-277, 1977.*
11. Potten, C. S. The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice. *Cancer Metastasis Rev, 11: 179-195, 1992.*

12. Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben Sasson, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119: 493-501, 1992.
13. Strater, J., Koretz, K., Gunthert, A. R., and Moller, P. In situ detection of enterocytic apoptosis in normal colonic mucosa and in familial adenomatous polyposis. *Gut*, 37: 819-825, 1995.
14. Williams, G. T. and Smith, C. A. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell*, 74: 777-779, 1993.
15. Bates, R. C., Buret, A., van Helden, D. F., Horton, M. A., and Burns, G. F. Apoptosis induced by inhibition of intercellular contact. *J Cell Biol*, 125: 403-415, 1994.
16. Boudreau, N., Werb, Z., and Bissell, M. J. Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 3509-3513, 1996.
17. Lu, Q. L., Abel, P., Foster, C. S., and Lalani, E. N. bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol*, 27: 102-110, 1996.
18. Krajewski, S., Krajewska, M., and Reed, J. C. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bak expression, a proapoptotic member of the Bcl-2 protein family. *Cancer Res*, 56: 2849-2855, 1996.
19. Moss, S. F., Agarwal, B., Arber, N., Guan, R. J., Krajewska, M., Krajewski, S., Reed, J. C., and Holt, P. R. Increased intestinal Bak expression results in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 223: 199-203, 1996.
20. Grossmann, J., Mohr, S., Lapentina, E. G., Fiocchi, C., and Levine, A. D. Sequential and rapid activation of select caspases during apoptosis of normal intestinal epithelial cells. *Am J Physiol*, 274: G1117-G1124, 1998.
21. Frisch, S. M. and Ruoslahti, E. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol*, 9: 701-706, 1997.
22. Strater, J., Wedding, U., Barth, T. F., Koretz, K., Elsing, C., and Moller, P. Rapid onset of apoptosis in vitro follows disruption of beta 1-integrin/matrix interactions in human colonic crypt cells. *Gastroenterology*, 110: 1776-1784, 1996.

23. Frisch, S. M. and Francis, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*, 124: 619-626, 1994.
24. Stallmach, A., Andus, T., Duchmann, R., and Hoffmann, C. Immunsuppressive Therapie bei chronisch entzündlichen Darmkrankheiten. Uni-Med Science, 2000.
25. Dignass, A. U. and Podolsky, D. K. Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta. *Gastroenterology*, 105: 1323-1332, 1993.
26. Reinecker, H. C. and Podolsky, D. K. Human intestinal epithelial cells express functional cytokine receptors sharing the common gamma c chain of the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 8353-8357, 1995.
27. Jung, H. C., Eckmann, L., Yang, S. K., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-Wroblewska, E., and Kagnoff, M. F. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest*, 95: 55-65, 1995.
28. Eckmann, L., Jung, H. C., Schurer-Maly, C., Panja, A., Morzycka-Wroblewska, E., and Kagnoff, M. F. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology*, 105: 1689-1697, 1993.
29. Daig, R., Rogler, G., Aschenbrenner, E., Vogl, D., Falk, W., Gross, V., Scholmerich, J., and Andus, T. Human intestinal epithelial cells secrete interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-8 but not interleukin-1 or interleukin-6. *Gut*, 46: 350-358, 2000.
30. Gross, V., Andus, T., Daig, R., Aschenbrenner, E., Scholmerich, J., and Falk, W. Regulation of interleukin-8 production in a human colon epithelial cell line (HT-29). *Gastroenterology*, 108: 653-661, 1995.
31. Daig, R., Andus, T., Aschenbrenner, E., Falk, W., Scholmerich, J., and Gross, V. Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 38: 216-222, 1996.

32. Reinecker, H. C., MacDermott, R. P., Mirau, S., Dignass, A., and Podolsky, D. K. Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin 15. *Gastroenterology*, 111: 1706-1713, 1996.
33. Spottl, T., Hausmann, M., Kreutz, M., Peuker, A., Vogl, D., Scholmerich, J., Falk, W., Andreesen, R., Andus, T., Herfarth, H., and Rogler, G. Monocyte differentiation in intestine-like macrophage phenotype induced by epithelial cells. *J Leukoc Biol*, 70: 241-251, 2001.
34. Spitz, J. C., Ghandi, S., Taveras, M., Aoys, E., and Alverdy, J. C. Characteristics of the intestinal epithelial barrier during dietary manipulation and glucocorticoid stress. *Crit Care Med*, 24: 635-641, 1996.
35. Sands B.E and Podolsky D.K. Towards new questions in inflammatory bowel disease in 1995. *Current Opin Gastroenterol*, 12: 319-321, 1996.
36. Rogler, G., Daig, R., Aschenbrenner, E., Vogl, D., Schlottmann, K., Falk, W., Gross, V., Scholmerich, J., and Andus, T. Establishment of long-term primary cultures of human small and large intestinal epithelial cells. *Lab Invest*, 78: 889-890, 1998.
37. Adler, G. Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa. Springer Verlag, 2.Auflage: 1996.
38. Rogler, G. and Andus, T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg*, 22: 382-389, 1998.
39. Schreiber, S., Heinig, T., Thiele, H. G., and Raedler, A. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 108: 1434-1444, 1995.
40. Schreiber, S., Heinig, T., Panzer, U., Reinking, R., Bouchard, A., Stahl, P. D., and Raedler, A. Impaired response of activated mononuclear phagocytes to interleukin 4 in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 108: 21-33, 1995.
41. Andus, T., Daig, R., Vogl, D., Aschenbrenner, E., Lock, G., Hollerbach, S., Kollinger, M., Scholmerich, J., and Gross, V. Imbalance of the interleukin-1 system in colonic mucosa-association with intestinal inflammation and interleukin 1 receptor antagonist genotype 2. *Gut*, 41: 651-657, 1997.

42. Sartor, R. B. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology*, 106: 533-539, 1994.
43. Heresbach, D., Semana, G., Gosselin, M., and Bretagne, M. G. An immunomodulation strategy targeted towards immunocompetent cells or cytokines in inflammatory bowel diseases (IBD). *Eur Cytokine Netw*, 10: 7-15, 1999.
44. Paul, S. R., Bennett, F., Calvetti, J. A., Kelleher, K., Wood, C. R., O'Hara, R. M., Jr., Leary, A. C., Sibley, B., Clark, S. C., and Williams, D. A. Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 7512-7516, 1990.
45. Schwertschlag, U. S., Trepicchio, W. L., Dykstra, K. H., Keith, J. C., Turner, K. J., and Dorner, A. J. Hematopoietic, immunomodulatory and epithelial effects of interleukin-11. *Leukemia*, 13 : 1307-1315, 1999.
46. Neben, S. and Turner, K. The biology of interleukin 11. *Stem Cells*, 11 Suppl 2:156-62: 156-162, 1993.
47. Du, X. and Williams, D. A. Interleukin-11: review of molecular, cell biology, and clinical use. *Blood*, 89: 3897-3908, 1997.
48. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 334: 297-314, 1998.
49. Yin, T., Taga, T., Tsang, M. L., Yasukawa, K., Kishimoto, T., and Yang, Y. C. Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11-mediated signal transduction. *J Immunol*, 151: 2555-2561, 1993.
50. Zhang, X. G., Gu, J. J., Lu, Z. Y., Yasukawa, K., Yancopoulos, G. D., Turner, K., Shoyab, M., Taga, T., Kishimoto, T., Bataille, R., and . Ciliary neurotropic factor, interleukin 11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M are growth factors for human myeloma cell lines using the interleukin 6 signal transducer gp130. *J Exp Med*, 179: 1337-1342, 1994.
51. Trepicchio, W. L. and Dorner, A. J. Interleukin-11. A gp130 cytokine. *Ann N Y Acad Sci*, 856:12-21: 12-21, 1998.

52. Dahmen, H., Horsten, U., Kuster, A., Jacques, Y., Minvielle, S., Kerr, I. M., Ciliberto, G., Paonessa, G., Heinrich, P. C., and Muller-Newen, G. Activation of the signal transducer gp130 by interleukin-11 and interleukin-6 is mediated by similar molecular interactions. *Biochem J*, 331: 695-702, 1998.
53. Fourcin, M., Chevalier, S., Lebrun, J. J., Kelly, P., Pouplard, A., Wijdenes, J., and Gascan, H. Involvement of gp130/interleukin-6 receptor transducing component in interleukin-11 receptor. *Eur J Immunol*, 24: 277-280, 1994.
54. Taga, T. and Kishimoto, T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol*, 15:797-819: 797-819, 1997.
55. Du, X. and Williams, D. A. Update on development of interleukin-11. *Curr Opin Hematol*, 2: 182-188, 1995.
56. Grosfeld, J. L., Du, X., and Williams, D. A. Interleukin-11: its biology and prospects for clinical use. *J Parenter Enteral Nutr*, 23: S67-S69, 1999.
57. Sands, B. E., Bank, S., Sninsky, C. A., Robinson, M., Katz, S., Singleton, J. W., Miner, P. B., Safdi, M. A., Galandiuk, S., Hanauer, S. B., Varilek, G. W., Buchman, A. L., Rodgers, V. D., Salzberg, B., Cai, B., Loewy, J., DeBruin, M. F., Rogge, H., Shapiro, M., and Schwertschlag, U. S. Preliminary evaluation of safety and activity of recombinant human interleukin 11 in patients with active Crohn's disease. *Gastroenterology*, 117: 58-64, 1999.
58. Hermann, J. A., Hall, M. A., Maini, R. N., Feldmann, M., and Brennan, F. M. Important immunoregulatory role of interleukin-11 in the inflammatory process in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 41: 1388-1397, 1998.
59. Leng, S. X. and Elias, J. A. Interleukin-11 inhibits macrophage interleukin-12 production. *J Immunol*, 159: 2161-2168, 1997.
60. Trepicchio, W. L., Bozza, M., Pedneault, G., and Dorner, A. J. Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down-regulation of proinflammatory cytokine release and nitric oxide production. *J Immunol*, 157: 3627-3634, 1996.
61. Trepicchio, W. L., Wang, L., Bozza, M., and Dorner, A. J. IL-11 regulates macrophage effector function through the inhibition of nuclear factor-kappaB. *J Immunol*, 159: 5661-5670, 1997.

62. Du, X. X., Doerschuk, C. M., Orazi, A., and Williams, D. A. A bone marrow stromal-derived growth factor, interleukin-11, stimulates recovery of small intestinal mucosal cells after cytoablative therapy. *Blood*, 83: 33-37, 1994.
63. Orazi, A., Du, X., Yang, Z., Kashai, M., and Williams, D. A. Interleukin-11 prevents apoptosis and accelerates recovery of small intestinal mucosa in mice treated with combined chemotherapy and radiation. *Lab Invest*, 75: 33-42, 1996.
64. Peterson, R. L., Wang, L., Albert, L., Keith, J. C., Jr., and Dorner, A. J. Molecular effects of recombinant human interleukin-11 in the HLA-B27 rat model of inflammatory bowel disease. *Lab Invest*, 78: 1503-1512, 1998.
65. Keith, J. C., Jr., Albert, L., Sonis, S. T., Pfeiffer, C. J., and Schaub, R. G. IL-11, a pleiotropic cytokine: exciting new effects of IL-11 on gastrointestinal mucosal biology. *Stem Cells*, 12 Suppl 1:79-89; discussion 89-90: 79-89, 1994.
66. Greenwood-Van Meerveld, B., Tyler, K., and Keith, J. C., Jr. Recombinant human interleukin-11 modulates ion transport and mucosal inflammation in the small intestine and colon. *Lab Invest*, 80: 1269-1280, 2000.
67. Alavi, K., Prasad, R., Lundgren, K., and Schwartz, M. Z. Interleukin-11 enhances small intestine absorptive function and mucosal mass after intestinal adaptation. *J Pediatr Surg*, 35: 371-374, 2000.
68. Cherel, M., Sorel, M., Lebeau, B., Dubois, S., Moreau, J. F., Bataille, R., Minvielle, S., and Jacques, Y. Molecular cloning of two isoforms of a receptor for the human hematopoietic cytokine interleukin-11. *Blood*, 86: 2534-2540, 1995.
69. Bazan, J. F. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 6934-6938, 1990.
70. Kurth, I., Horsten, U., Pflanz, S., Dahmen, H., Kuster, A., Grotzinger, J., Heinrich, P. C., and Muller-Newen, G. Activation of the signal transducer glycoprotein 130 by both IL-6 and IL-11 requires two distinct binding epitopes. *J Immunol*, 162: 1480-1487, 1999.
71. Hilton, D. J., Hilton, A. A., Raicevic, A., Rakar, S., Harrison-Smith, M., Gough, N. M., Begley, C. G., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Willson, T. A. Cloning of a

- murine IL-11 receptor alpha-chain; requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction. *EMBO J*, 13: 4765-4775, 1994.
72. Van Leuven, F., Stas, L., Hilliker, C., Miyake, Y., Bilinski, P., and Gossler, A. Molecular cloning and characterization of the human interleukin-11 receptor alpha-chain gene, IL11RA, located on chromosome 9p13. *Genomics*, 31: 65-70, 1996.
73. Lebeau, B., Montero Julian, F. A., Wijdenes, J., Muller-Newen, G., Dahmen, H., Cherel, M., Heinrich, P. C., Brailly, H., Hallet, M. M., Godard, A., Minvielle, S., and Jacques, Y. Reconstitution of two isoforms of the human interleukin-11 receptor and comparison of their functional properties. *FEBS Lett*, 407: 141-147, 1997.
74. Peterson, R. L., Bozza, M. M., and Dorner, A. J. Interleukin-11 induces intestinal epithelial cell growth arrest through effects on retinoblastoma protein phosphorylation. *Am J Pathol*, 149: 895-902, 1996.
75. Robb, L., Hilton, D. J., Willson, T. A., and Begley, C. G. Structural analysis of the gene encoding the murine interleukin-11 receptor alpha-chain and a related locus. *J Biol Chem*, 271: 13754-13761, 1996.
76. Nandurkar, H. H., Hilton, D. J., Nathan, P., Willson, T., Nicola, N., and Begley, C. G. The human IL-11 receptor requires gp130 for signalling: demonstration by molecular cloning of the receptor. *Oncogene*, 12: 585-593, 1996.
77. Barton, V. A., Hall, M. A., Hudson, K. R., and Heath, J. K. Interleukin-11 Signals through the Formation of a Hexameric Receptor Complex. *J Biol Chem*, 275: 36197-36203, 2000.
78. Kishimoto, T. Signal transduction through homo- or heterodimers of gp130. *Stem Cells*, 12 Suppl 1: 37-44, 1994.
79. Berger, L. C., Hawley, T. S., Lust, J. A., Goldman, S. J., and Hawley, R. G. Tyrosine phosphorylation of JAK-TYK kinases in malignant plasma cell lines growth-stimulated by interleukins 6 and 11. *Biochem Biophys Res Commun*, 202: 596-605, 1994.
80. Ihle, J. N. Cytokine receptor signalling. *Nature*, 377: 591-594, 1995.

81. Zhong, Z., Wen, Z., and Darnell, J. E. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*, 264: 95-98, 1994.
82. Yin, T., Yasukawa, K., Taga, T., Kishimoto, T., and Yang, Y. C. Identification of a 130-kilodalton tyrosine-phosphorylated protein induced by interleukin-11 as JAK2 tyrosine kinase, which associates with gp130 signal transducer. *Exp Hematol*, 22: 467-472, 1994.
83. Pellegrini, S. and Dusanter-Fourt, I. The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur J Biochem*, 248: 615-633, 1997.
84. Ihle, J. N. The Janus protein tyrosine kinase family and its role in cytokine signaling. *Adv Immunol*, 60:1-35. : 1-35, 1995.
85. Zhong, Z., Wen, Z., and Darnell, J. E. Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 4806-4810, 1994.
86. Ihle, J. N. STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell*, 84: 331-334, 1996.
87. Darnell, J. E. STATs and gene regulation. *Science*, 277: 1630-1635, 1997.
88. Zhang, X., Blenis, J., Li, H. C., Schindler, C., and Chen-Kiang, S. Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science*, 267: 1990-1994, 1995.
89. Howard A. and Pelc, S. R. Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity (Edinburgh)*, 6: 261-273, 1953.
90. Blanc, C., Vusio, P., Schleinkofer, K., Boisteau, O., Pflanz, S., Minvielle, S., Grotzinger, J., Muller-Newen, G., Heinrich, P. C., Jacques, Y., and Montero-Julian, F. A. Monoclonal antibodies against the human interleukin-11 receptor alpha-chain (IL-11Ralpha) and their use in studies of human mononuclear cells. *J Immunol Methods*, 241: 43-59, 2000.

91. Grossmann, J., Maxson, J. M., Whitacre, C. M., Orosz, D. E., Berger, N. A., Fiocchi, C., and Levine, A. D. New isolation technique to study apoptosis in human intestinal epithelial cells. *Am J Pathol*, 153: 53-62, 1998.
92. Grossmann, J., Walther, K., Artinger, M., Kiessling, S., and Scholmerich, J. Apoptotic Signaling during Initiation of Detachment-induced Apoptosis ("Anoikis") of Primary Human Intestinal Epithelial Cells. *Cell Growth Differ*, 12: 147-155, 2001.
93. Frisch, S. M. and Screaton, R. A. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*, 13: 555-562, 2001.
94. Booth, C. and Potten, C. S. Effects of IL-11 on the growth of intestinal epithelial cells in vitro. *Cell Prolif*, 28: 581-594, 1995.
95. Grad, J. M., Zeng, X. R., and Boise, L. H. Regulation of Bcl-xL: a little bit of this and a little bit of STAT. *Curr Opin Oncol*, 12: 543-549, 2000.
96. Frisch, S. M. Anoikis. *Methods Enzymol*, 322:472-9.: 472-479, 2000.
97. Campbell, C. L., Guardiani, R., Ollari, C., Nelson, B. E., Quesenberry, P. J., and Savarese, T. M. Interleukin-11 receptor expression in primary ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol*, 80: 121-127, 2001.
98. Douglas, A. M., Goss, G. A., Sutherland, R. L., Hilton, D. J., Berndt, M. C., Nicola, N. A., and Begley, C. G. Expression and function of members of the cytokine receptor superfamily on breast cancer cells. *Oncogene*, 14: 661-669, 1997.
99. Campbell, C. L., Jiang, Z., Savarese, D. M., and Savarese, T. M. Increased expression of the interleukin-11 receptor and evidence of STAT3 activation in prostate carcinoma. *Am J Pathol*, 158: 25-32, 2001.
100. Nandurkar, H. H., Robb, L., Nicholl, J. K., Hilton, D. J., Sutherland, G. R., and Begley, C. G. The gene for the human interleukin-11 receptor alpha chain locus is highly homologous to the murine gene and contains alternatively spliced first exons. *Int J Biochem Cell Biol*, 29: 753-766, 1997.
101. Mahboubi, K., Biedermann, B. C., Carroll, J. M., and Pober, J. S. IL-11 activates human endothelial cells to resist immune-mediated injury. *J Immunol*, 164: 3837-3846, 2000.

102. Chevalier, S., Fourcin, M., Robledo, O., Wijdenes, J., Pouplard-Barthelaix, A., and Gascan, H. Interleukin-6 family of cytokines induced activation of different functional sites expressed by gp130 transducing protein. *J Biol Chem*, 271: 14764-14772, 1996.
103. Yin, T., Miyazawa, K., and Yang, Y. C. Characterization of interleukin-11 receptor and protein tyrosine phosphorylation induced by interleukin-11 in mouse 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*, 267: 8347-8351, 1992.
104. Yang, Y. C. and Yin, T. Interleukin (IL)-11--mediated signal transduction. *Ann N Y Acad Sci*, 762: 31-40, 1995.
105. Bromberg, J. F. Activation of STAT proteins and growth control. *Bioessays*, 23: 161-169, 2001.
106. Bromberg, J. and Darnell, J. E., Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*, 19: 2468-2473, 2000.
107. Akira, S. IL-6-regulated transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol*, 29: 1401-1418, 1997.
108. Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C., and Darnell, J. E., Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell*, 98: 295-303, 1999.
109. Krebs, D. L. and Hilton, D. J. SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci*, 113: 2813-2819, 2000.
110. Qiu, B. S., Pfeiffer, C. J., and Keith, J. C. Protection by recombinant human interleukin-11 against experimental TNB-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci*, 41: 1625-1630, 1996.
111. Opal, S. M., Jhung, J. W., Keith, J. C., Jr., Goldman, S. J., Palardy, J. E., and Parejo, N. A. Additive effects of human recombinant interleukin-11 and granulocyte colony-stimulating factor in experimental gram-negative sepsis. *Blood*, 93: 3467-3472, 1999.
112. Opal, S. M., Keith, J. C., Palardy, J. E., and Parejo, N. Recombinant human interleukin-11 has anti-inflammatory actions yet does not exacerbate systemic *Listeria* infection. *J Infect Dis*, 181: 754-756, 2000.

113. Bozza, M., Bliss, J. L., Dorner, A. J., and Trepicchio, W. L. Interleukin-11 Modulates Th1/Th2 Cytokine Production from Activated CD4⁺ T Cells. *J Interferon Cytokine Res*, 21: 21-30, 2001.
114. Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., Knuechel, R., Baeuerle, P. A., Scholmerich, J., and Gross, V. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology*, 115: 357-369, 1998.
115. Trepicchio, W. L., Ozawa, M., Walters, I. B., Kikuchi, T., Gilleaudeau, P., Bliss, J. L., Schwertschlag, U., Dorner, A. J., and Krueger, J. G. Interleukin-11 therapy selectively downregulates type I cytokine proinflammatory pathways in psoriasis lesions. *J Clin Invest*, 104: 1527-1537, 1999.
116. Gadiant, R. A. and Patterson, P. H. Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. *Stem Cells*, 17: 127-137, 1999.
117. Booth, D. and Potten, C. S. Protection against mucosal injury by growth factors and cytokines. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 16-20, 2001.
118. Du, X., Liu, Q., Yang, Z., Orazi, A., Rescorla, F. J., Grosfeld, J. L., and Williams, D. A. Protective effects of interleukin-11 in a murine model of ischemic bowel necrosis. *Am J Physiol*, 272: G545-G552, 1997.
119. Scordi, I. A., Nassiri, M., Hanly, A. J., and Vincek, V. Interleukin 11 reduces apoptosis in UVB-irradiated mouse skin. *Dermatology*, 199: 296-301, 1999.
120. Kaye, J. A. Clinical development of recombinant human interleukin-11 to treat chemotherapy-induced thrombocytopenia. *Curr Opin Hematol*, 3: 209-215, 1996.
121. Potten, C. S. Protection of the small intestinal clonogenic stem cells from radiation-induced damage by pretreatment with interleukin 11 also increases murine survival time. *Stem Cells*, 14: 452-459, 1996.
122. Fukada, T., Hibi, M., Yamanaka, Y., Takahashi-Tezuka, M., Fujitani, Y., Yamaguchi, T., Nakajima, K., and Hirano, T. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity*, 5: 449-460, 1996.

123. Chen, R. H., Chang, M. C., Su, Y. H., Tsai, Y. T., and Kuo, M. L. Interleukin-6 inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and signal transducers and activators of transcription 3 pathways. *J Biol Chem*, 274: 23013-23019, 1999.
124. Chung, T. D., Yu, J. J., Kong, T. A., Spiotto, M. T., and Lin, J. M. Interleukin-6 activates phosphatidylinositol-3 kinase, which inhibits apoptosis in human prostate cancer cell lines. *Prostate*, 42: 1-7, 2000.
125. Fuhrer, D. K. and Yang, Y. C. Activation of Src-family protein tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 mouse preadipocytes by interleukin-11. *Exp Hematol*, 24: 195-203, 1996.
126. Zhang, H., Xu, Q., Krajewski, S., Krajewska, M., Xie, Z., Fuess, S., Kitada, S., Godzik, A., and Reed, J. C. BAR: An apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 2597-2602, 2000.
127. Zhang, X. M., Lin, H., Chen, C., and Chen, B. D. Inhibition of ubiquitin-proteasome pathway activates a caspase-3-like protease and induces Bcl-2 cleavage in human M-07e leukaemic cells. *Biochem J*, 340: 127-133, 1999.
128. Renvoize, C., Roger, R., Moulian, N., Bertoglio, J., and Breard, J. Bcl-2 expression in target cells leads to functional inhibition of caspase-3 protease family in human NK and lymphokine-activated killer cell granule-mediated apoptosis. *J Immunol*, 159: 126-134, 1997.
129. Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S. A., and Kroemer, G. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene*, 16: 2265-2282, 1998.
130. Burgering, B. M. and Coffey, P. J. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*, 376: 599-602, 1995.
131. Datta, S. R., Brunet, A., and Greenberg, M. E. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*, 13: 2905-2927, 1999.
132. Franke, T. F., Kaplan, D. R., and Cantley, L. C. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, 88: 435-437, 1997.

133. Coffe, P. J. and Woodgett, J. R. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem*, 205: 1217, 1992.
134. Franke, T. F. and Cantley, L. C. Apoptosis. A Bad kinase makes good. *Nature*, 390: 116-117, 1997.
135. Abreu, M. T., Arnold, E. T., Chow, J. Y., and Barrett, K. E. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways oppose Fas-induced apoptosis and limit chloride secretion in human intestinal epithelial cells. Implications for inflammatory diarrheal states. *J Biol Chem*, 276: 47563-47574, 2001.

VIII ANHANG

Publikationen

J. Grossmann, K. Walther, M. Artinger, **S. Kiessling**, J. Schölmerich. Apoptotic signaling during initiation of detachment-induced apoptosis ("Anoikis") of primary intestinal epithelial cells.

Cell Growth Differ 2001 12: 147-155.

M. Hausmann, **S. Kiessling**, S. Mestermann, G. Webb, T. Spöttl, T. Andus, J. Schölmerich, H. Herfarth, K. Ray, W. Falk, G. Rogler. Toll like receptors 2 and 4 are upregulated during intestinal inflammation.

Angenommen bei Gastroenterology (in Druck).

S. Kiessling, G. Mueller-Newen, S. N. Leeb, K. Schlottmann, J. Grossmann, F. A. Montero-Julian, J. Schölmerich, T. Andus, P. C. Heinrich, G. Rogler. Functional expression of the interleukin-11 receptor α -chain in human colonic epithelial cells.

Eingereicht bei Gastroenterology.

Kongressbeiträge

S. Kiessling, G. Rogler, D. Vogl, M. Brunner, W. Falk, J. Schölmerich, T. Andus. CD40 is induced by interferon gamma in colonic myofibroblasts and mediates activation and cytokine secretion by CD40 ligand.

Falk Symposium 111, Freiburg (1999).

S. Kiessling, F.-P. Wachs, W. Falk, J. Schölmerich, T. Andus, G. Rogler. Colonic epithelial cells produce two isoforms of IL-15 which are not secreted.

Digestive Disease Week, San Diego, California, USA (2000).

S. Kiessling, G. Mueller-Newen, C. Blanc, F.-P. Wachs, L. Weger, J. Schölmerich, F.A. Montero, T. Andus, P.C. Heinrich, G. Rogler. IL-11 Receptor (IL-11R α) is mainly expressed on epithelial cells in normal colonic mucosa.

Digestive Disease Week, San Diego, California, USA (2000).

F.-P. Wachs, K. Schlottmann, **S. Kiessling**, D. Vogl, M. Brunner, W. Falk, J. Schölmerich, T. Andus, G. Rogler. Secretion and expression of IL-8 in IFN γ stimulated human colonic epithelial cells depends on cell differentiation.

Digestive Disease Week, San Diego, California, USA (2000).

S. Kiessling, G. Mueller-Newen, W. Falk, J. Schölmerich, T. Andus, P.C. Heinrich, G. Rogler. Die Expression des IL-11 Rezeptors α (IL-11R α) in der intestinalen Mukosa ist auf Epithelzellen beschränkt.

55. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Hamburg (2000).

S. Kiessling, K. Schlottmann, W. Falk, T. Andus, J. Schölmerich, G. Rogler. IFN- γ induces transcription but not secretion of IL-18 in human colonic epithelial cells.

Digestive Disease Week, Atlanta, Georgia, USA (2001).

S. Kiessling, G. Mueller-Newen, W. Falk, J. Schölmerich, T. Andus, P.C. Heinrich, G. Rogler. Nachweis der funktionellen Expression des IL-11 Rezeptors α (IL-11R α) auf Kolonepithelzellen.

56. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Münster (2001).

Hausmann M, T. Spöttl, **S. Kiessling**, S. Mestermann, J. Schölmerich, T. Andus, H. Herfarth, W. Falk, G. Rogler. Die Toll like Rezeptoren 2 und 4 sind während intestinaler Entzündungen hochreguliert.

56. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Münster (2001).

S. Kiessling, K. Schlottmann, F.A. Montero, T. Andus, J. Schölmerich, G. Mueller-Newen, P.C. Heinrich, G. Rogler. Functional expression of the Interleukin-11 receptor α -chain (IL-11R α) in human colonic epithelial cells.

9th United European Gastroenterology Week (UEGW), Amsterdam, The Netherlands (2001).

S. Kiessling, M. Hausmann, W. Falk, J. Schoelmerich, J. Grossmann, G. Rogler. Analysis of downstream effects of IL-11-induced signaling in human colonic epithelial cells.

Digestive Disease Week, San Francisco, California, USA (2002).

R. Altmann, M. Gruber, M. Hausmann, **S. Kiessling**, S.N. Leeb, W. Falk, J. Schölmerich, G. Rogler. Endogenous and exogenous PPAR- γ -Ligands inhibit the inflammatory response of intestinal epithelial cells.

Digestive Disease Week, San Francisco, California, USA (2002).

Danksagung

Zum Gelingen meiner Dissertation haben viele Leute beigetragen, denen ich allen großen Dank schulde. Sei es durch eine großzügige Förderung meiner Arbeit, die Anleitung, die Betreuung, die Einweisung in neue Arbeitstechniken, die Unterstützung im Labor, das stete Interesse am Fortgang meiner Arbeit oder das außerordentlich gute Arbeitsklima.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. Schölmerich für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I.

Herrn Prof. Dr. A. Buschauer danke ich für die Bereitschaft, die fakultätsinterne Betreuung und Vertretung dieser Arbeit zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Dr. G. Rogler für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und für die Freiheit, eigene Ideen mit einbringen zu dürfen. Seine zahlreichen Anregungen und die ständige Diskussionsbereitschaft bei der Leitung dieser Arbeit waren eine sehr wichtige Hilfe und eine wertvolle Erfahrung.

Frau Prof. Dr. C. Steinem und Herrn Prof. Dr. G. Schmeer danke ich für die Teilnahme am Prüfungsausschuss.

Herrn Prof. Dr. P. C. Heinrich und Herrn PD Dr. G. Müller-Newen (Institut für Biochemie, Universitätsklinikum Aachen) danke ich für die Zurverfügungstellung des monoklonalen anti-IL-11R α Antikörpers E24.2.

Bei den Ärzten aus der Chirurgie und den Kollegen aus der Pathologie möchte ich mich für die Bereitstellung von primären Darmgewebe bedanken.

Herrn Prof. Dr. W. Falk und Herrn Dr. K. Schlottmann danke ich für die wissenschaftliche Anleitung dieser Arbeit und ihren oftmals unkonventionellen Hilfeleistungen.

Ein ganz besonderer Dank geht an alle Arbeitskollegen aus dem Forschungsbau H1. Die Verständigung war immer ausgezeichnet und sehr produktiv. Der R70-Crew möchte ich ganz besonders für das überaus angenehme Arbeitsklima und die stets gewährte Hilfeleistung danken.

Meinen Kolleginnen und Kollegen aus unserer Arbeitsgruppe, Dr. Reinhold Altmann, Sabine Fink, Manuela Gunckel, Dr. Martin Hausmann, Silvia Kellermeier, Sandra Leeb, Monika Mändl, Dr. Tanja Spöttl und Daniela Vogl möchte ich sehr herzlich für die freundliche Zusammenarbeit und deren permanenter Ansprechbarkeit besonders danken.

Mein bester Dank gilt vor allem meinen Eltern, die mir durch ihre immerwährende Unterstützung diese Ausbildung überhaupt erst ermöglicht haben.

Mein vornehmlicher Dank gilt nicht zuletzt Sabine, für ihre Liebe, Geduld und Unterstützung besonders in schwierigen Phasen während dieser Arbeit.

Zuletzt gilt nun mein Dank allen denen, die es verdient haben, ich aber leider vergessen habe hier zu nennen.

VIELEN DANK!

Regensburg, im Februar 2002

Stephan Kießling

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Regensburg, den 25.02.2002

Stephan Kießling